

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION (PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 04 November 1999 (04.11.99)	
International application No.: PCT/JP99/01834	Applicant's or agent's file reference: P99-10
International filing date: 06 April 1999 (06.04.99)	Priority date: 28 April 1998 (28.04.98)
Applicant: NAKAMURA, Toshikazu	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
06 September 1999 (06.09.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

E P



P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[P C T 1 8 条、P C T 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 P 9 9 - 1 0	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 1 8 3 4	国際出願日 (日.月.年) 0 6 . 0 4 . 9 9	優先日 (日.月.年) 2 8 . 0 4 . 9 8
出願人 (氏名又は名称) 中 木 寸 毎 女		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-13 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 11-13 は、人間の予防または処置方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.⁸ A61K38/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.⁸ A61K38/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), Swissprot, PIR, GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	DATE, K., et al., 'HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor' FEBS Lett., 1997, Vol.420, No.1, p.1-6, 全文参照	1-10, 14
Y	BUSSOLINO, F., et al., 'Hepatocyte Growth Factor Is a Potent Angiogenic Factor Which Stimulates Endothelial Cell Motility and Growth' J. Cell. Biol., 1992, Vol.119, No.3, p.629-641 Abstract, p.636-638: 'In Vivo Angiogenic Effect of HGF' 参照	1-10, 14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.06.99

国際調査報告の発送日

15.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
大宅 郁治



4C 9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	NISHIMURA, M., et al., 'Serum Hepatocyte Growth Factor as a Possible Indicator of Vascular Lesions' Rinsho Byori, 1997, Vol.45, No.9, p.831-836 要約及び考察を参照 (see also Chemical Abstracts, 1997, Vol.127, No.18, abst. no. 246281y)	1-10, 14
Y	EP, 4 6 1 5 6 0, A 1 (NAKAMURA, Toshikazu), 18. 12月. 1991 (18. 12. 91), Fig.2 参照 & JP, 5-111383, A	1-10, 14

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 01 MAY 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 P 9 9 - 1 0	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 9 9 / 0 1 8 3 4	国際出願日 (日.月.年) 0 6 . 0 4 . 9 9	優先日 (日.月.年) 2 8 . 0 4 . 9 8
国際特許分類 (IPC) Int. cl ⁷ A 6 1 K 3 8 / 1 8 , A 6 1 P 2 9 / 0 0 , 1 7 / 0 6 , 9 / 1 0 , 9 / 0 0 , 3 5 / 0 0 , 1 / 0 0 , 1 7 / 0 0 , 1 9 / 0 2		
出願人 (氏名又は名称) 中 村 敏 一		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。 <input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で 2 2 ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 0 6 . 0 9 . 9 9	国際予備審査報告を作成した日 1 3 . 0 4 . 0 0	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新 留 豊	4 C 9 6 3 9
電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-5, 14-33, 35-37, 39, 41-45 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 6-13/1, 34, 38, 40 ページ、 07.02.00 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 1 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 2-18 項、 07.02.00 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-13 ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 ページ/図、 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 明細書の配列表の部分 第 1/8 - 8/8 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 ページ、 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

Ⅴ 請求の範囲 12-16

☒ この国際出願又は請求の範囲 12-16 は、国際予備審査をすることを要しない
 次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲12-16は、治療による人体の処置方法に該当し、PCT34条(4)(a)(i)及びPCT規則67.1(iv)の規定により、この国際予備審査機関が国際予備審査を行うことを要しない対象に係るものである。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 _____ の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 _____ が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 12-16 について、国際調査報告が作成されていない。

2. スクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-11, 17, 18	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-11, 17, 18	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-11, 17, 18	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1: DATE, K., et al., 'HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor'
FEBS Lett., 1997, Vol.420, No.1, p.1-6, 全文参照

文献2: BUSSOLINO, F., et al., 'Hepatocyte Growth Factor Is a Potent Angiogenic Factor Which Stimulates Endothelial Cell Motility and Growth'
J. Cell. Biol., 1992, Vol.119, No.3, p.629-641
Abstract, p.636-638: 'In Vivo Angiogenic Effect of HGF' 参照

文献3: NISHIMURA, M., et al., 'Serum Hepatocyte Growth Factor as a Possible Indicator of Vascular Lesions'
Rinsho Byori, 1997, Vol.45, No.9, p.831-836

説明:

文献1は、HGFのPyrGlu32~Val478からなるアミノ酸配列を有するペプチド（以下、HGF/NK4という）が、HGFとその受容体であるc-Met/HGFの結合を拮抗阻害し、HGFの有する、マイトゲン(mitogenic)、モートゲン(motogen)、及びモルフォゲン(morphogen)活性等の生理活性を阻害することを開示している（文献1の「Abstract」、「Fig.1」、「Fig.3」、「3.2 Receptor Analysis」及び「Discussion」）。

一方で、文献1（「Introduction」）、文献2（「Abstract」）、及び文献3（要約）は、HGFが血管新生を引き起こし、内皮細胞を刺激することを開示している。HGF/NK4がHGFに対して特異的阻害活性を有するという、文献1の開示事項を考慮すれば、HGFを介した血管新生誘導、あるいは内皮細胞活性化の阻害にHGF/NK4を用いること、そして、血管新生あるいは内皮細胞活性化の阻害効果がある物質を、それらの現象に深く関連するリウマチ性関節炎あるいは腸管癒着等の具体的疾患に適用してみることは、一見当業者に自明であると思われる。

しかしながら、出願人が答弁書において主張するとおり、HGF/NK4は、HGFの作用のみならず、HGFとはレセプターの異なるVEGFやbFGFによって促進される、血管内皮細胞の増殖等をも抑制することが示されており（実施例8）、上記文献からは予想できない効果を有するものである。このことから、本願発明は上記文献から自明のものではない。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

したがって、請求の範囲 1-11、17 及び 18 に係る発明は進歩性を有する。

請求の範囲 1-11、17 及び 18 に係る発明は、産業上の利用可能性を有する。

本発明者らは、上記目的に基づいて新規な血管新生抑制因子を求めて日夜研究を重ねていたところ、Hepatocyte growth factor (HGF) の α 鎖の特定領域を含む蛋白質に血管の新生を有意に抑制する作用があることを見
5 いだして本発明を開発するに至った。

HGF は、そもそも本発明者によって 1984 年に肝実質細胞の新規増殖因子として見いだされたポリペプチドである (Nakamura T., et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 1984, 122, pp. 1450-1459)。本発明者のその後
10 の研究によって、HGF は分子量約 69 kDa の α 鎖と約 34 kDa の β 鎖からなるヘテロダイマーであり、しかもその構造は、 α 鎖に N 末端ヘアピンドメインと 4 つのクリングルドメインを有し、また β 鎖にセリンプロテアーゼ様ドメインを有するユニークなドメイン構造である
15 ことがわかった (Nakamura T., et al., *Nature* 1989, 342, pp. 440-443)。HGF の発見当初は肝再生因子の本体として肝細胞に特異性の高い増殖因子であると考えられていたが、リコンビナント HGF が使用できるようになった 1989 年以降の研究により、HGF は肝細胞以外
20 にも多くの上皮細胞に対して強力なマイトゲンとして働くことが明らかになった (Nakamura T., Princess Takamatsu Symp., 1994, 24, pp. 195-213. Review)。ま

た、更なる研究によって H G F はかかる細胞増殖制御に加えて、細胞運動 (cell motility) を促進するモートゲン (motogen) としての機能 (T. Nakamura, Prog. growth Factor Res., 3, pp. 67-85, 1991) や、多くの癌細胞の増殖を抑制する tumor suppressor 作用などの新しい生物活性を有することがわかった (Higashio K, et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 1990, July 16, 170(1), pp. 397-404)。

さらに 1991 年には、H G F の高親和性で機能的なレセプターが、プロトオンコジーン産物 (c - m e t 産物 : c - M e t) であることが明らかとなり (Bottaro D P, et al., *Science*, 1991, Feb., 15, 251(4995), pp. 802-804; Naldini L, et al., *Oncogene*, 1991 Apr, 6(4), pp. 501-504)、本発明者は、 α 鎖内の N 末端ヘアピンならびに第 1、第 2 クリングルドメインが該 c - M e t / H G F レセプターに結合する最小ドメインであることを見いだした (Matsumoto K, et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 1991 Dec., 16, 181(2), pp. 691-699)。

本発明者はかかる H G F に関する一連の研究成果をさらに追究すべく研究を行っていたところ、本発明に先だち α 鎖内の N 末端ヘアピンならびに第 1 から第 4 の 4 つのクリングルドメインを有するポリペプチドが、上記 c

— M e t / H G F レセプターを介する H G F の作用に対してアンタゴニスト活性を有していることを新たに見だし、かかるポリペプチドが H G F の血管新生作用を有意に抑制する作用を有することを確認した。

- 5 本発明は、このような年余にわたる H G F の研究を基礎として上記新規な知見に基づいてなされたものである。

すなわち、本発明は下記 1 ～ 6 に掲げる血管新生抑制剤である。

- 10 1 . 下記の (a) 又は (b) に記載されるポリペプチドを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

(a) Hepatocyte growth factor (H G F) の P y r G l u
3 2 ~ V a l 4 7 8 からなるアミノ酸配列を有するポリペ
プチド、

- 15 (b) (a) のアミノ酸配列において、 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c - M e t / H G F レセプターを介する H G F の作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド。

- 20 2 . 下記の (a) 又は (b) に記載されるポリペプチドを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

(a) Hepatocyte growth factor (H G F) の P y r G l u

^{3 2} ~ Val^{4 7 8} からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、c - M e t / H G F レセプターを介する H G F の作用に対するアンタゴニスト活性、並びに b F G F 及び / 又は V E G F に起因する血管内皮細胞の増殖を抑制する作用を有するポリペプチド。

10 3 . 上記ポリペプチドが、少なくとも一つのヘアピンドメイン及び4つのクリングルドメインを有するものである1又は2記載の血管新生抑制剤。

4 . 上記ポリペプチドがHepatocyte growth factorをエラスターゼで消化して得られるものである1又は2記載の血管新生抑制剤。

5 . 配列番号1記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤。

6 . 配列番号2記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤。

20

また本発明は、下記7 ~ 11に掲げる、医学的若しくは薬理学的に有用な医薬品である。

7. 1 又は 2 に記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む、血管異常増殖に起因する疾患の予防又は治療剤。
8. 血管異常増殖に起因する疾患が、リウマチ性関節炎、乾癬、オスラー-ウェバー (Osler-Webber) 症候群、心筋の脈管形成、末梢血管拡張症、血友病性関節症、眼の脈管形成性疾患、血管線維腫、良性腫瘍及び創傷肉芽形成よりなる群から選択されるいずれかである 7 記載の予防又は治療剤。
9. 1 又は 2 に記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む、内皮細胞の過度な刺激によって生じる疾患の予防又は治療剤。
10. 内皮細胞の過度な刺激によって生じる疾患が、腸管癒着、クローン病、アテローム硬化症、強皮症及び過剰瘢痕形成よりなる群から選択されるいずれかである 9 記載の予防又は治療剤。
11. 1 又は 2 に記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む受胎調節剤。
- 20 更にまた本発明は、下記 12 ～ 16 に掲げる、医学的若しくは薬理学的に有用な処置方法である。
12. 下記 (a) 又は (b) に記載されるポリペプチド：

(a) Hepatocyte growth factor (H G F) の PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ からなる アミノ酸配列を有するポリペプチド、

5 (b) (a) の アミノ酸配列において、1 若しくは複数の アミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c - M e t / H G F レセプターを介する H G F の作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド、

及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を
10 被験者に投与することからなる、血管新生抑制方法。

13. 下記 (a) 又は (b) に記載されるポリペプチド：

(a) Hepatocyte growth factor (H G F) の PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ からなる アミノ酸配列を有するポリペプチド、

15 (b) (a) の アミノ酸配列において、1 若しくは複数の アミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、c - M e t / H G F レセプターを介する H G F の作用に対するアンタゴニスト活性、並びに b F G F 及び / 又は V E G F に起因する血管内皮細胞の増殖を抑制する作用を有する
20 ポリペプチド、

及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を

被験者に投与することからなる、血管新生抑制方法。

14. 下記(a)又は(b)に記載されるポリペプチド：

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) のPyrGlu³²～Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつc-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド、

及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を血管異常増殖に起因する疾患の予防または治療をうける被験者に投与することからなる、該疾患の予防または治療方法。

15. 15. 下記(a)又は(b)に記載されるポリペプチド：

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) のPyrGlu³²～Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、c-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対するアンタゴニス

ト活性、並びに b F G F 及び／又は V E G F に起因する血管内皮細胞の増殖を抑制する作用を有するポリペプチド、

5 及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を血管異常増殖に起因する疾患の予防または治療をうける被験者に投与することからなる、該疾患の予防または治療方法。

16. 上記疾患が、リウマチ性関節炎、乾癬、オスラー-ウェバー (Osler-Webber) 症候群、心筋の脈管形成、
10 末梢血管拡張症、血友病性関節症、眼の脈管形成性疾患、血管線維腫、良性腫瘍、創傷肉芽形成、腸管癒着、クローン病、アテローム硬化症、強皮症及び過剰瘢痕形成よりなる群から選択されるいずれかである 14 又は 15 に記載の予防又は治療方法。

15

また、本発明は下記 17 及び 18 に記載するポリペプチドの使用に関する：

17. 血管新生抑制剤の製造のための下記 (a) 又は (b) に記載されるポリペプチドの使用：

20 (a) Hepatocyte growth factor (H G F) の PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Met / HGF レセプターを介する HGF の作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド。

18. 血管新生抑制剤の製造のための、下記 (a) 又は

(b) に記載されるポリペプチドの使用：

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) の PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、c-Met / HGF レセプターを介する HGF の作用に対するアンタゴニスト活性、並びに bFGF 及び / 又は VEGF に起因する血管内皮細胞の増殖を抑制する作用を有するポリペプチド。

なお、本明細書において、アミノ酸、ペプチド、塩基配列その他に関する略号による表示は、基本的には IUPAC 及び IUPAC - IUB による命名法又はその規定、及び「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の

作成のためのガイドライン」(平成9年3月、特許庁調整課審査基準室)に従うものとする。

また、本発明において、アミノ酸番号やアミノ酸の位置は、プレプロHGFのアミノ酸配列を基準として表記する (Nakamura T., et al., *Nature* 1989, 342, pp. 440-443)。本発明で、PyrGluとは、修飾アミノ酸であるピログルタメート (pyroglutamate) を意味し、PyrGlu³²とは、プレプロHGFのアミノ酸配列を基準としてN末端から32番目のアミノ酸残基が、ピログルタメートになっていることを示す。

本発明の血管新生抑制剤は、HGFの α 鎖に起因するものであって血管新生抑制作用を有するポリペプチドを

15

20

有効成分として含有するものである。

ここで「HGFの α 鎖に起因する」とは、HGFの α 鎖の全領域又はその断片を連続的もしくは非連続的に有するという意味で用いられる。

5 血管新生抑制作用とは、血管の新生作用を抑制する作用であればその機序の別を問うものではないが、HGFが有する血管新生作用を抑制する作用、好適にはHGF、VEGF、bFGFが有する血管新生作用を抑制する作用を意味する。

10 かかる作用を有するポリペプチドとしては、HGFのレセプターであるc-Met/HGFレセプターに親和性を有し、該レセプターへのHGFの結合を競合的に阻害する作用を有するものを挙げることができる。好適には、c-Met/HGFレセプターに結合して、c-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対して
15 アンタゴニスト活性を有するポリペプチドである。

 c-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用としては、c-Met/HGFレセプターのチロシンリン酸化作用、モートゲン活性 (motogenic activity)、
20 マイトゲン活性 (mitogenic activity) 及びモルフォゲン活性 (morphogenic activity) を挙げることができる
 (実験医学, Vol. 11, No. 9 (1993) 参照)。

従って、本発明で用いられるポリペプチドとしては、

5

10

15

20

囲の各濃度の H G F / N K 4 を添加して 3 7 ℃、5 % C O₂ で培養した。7 2 時間後、トリプシンで細胞を剥がし、Coulter counter で細胞数を計測した。

ヒト肺微小血管内皮細胞についての結果を図 5 に、ヒ
5 ト皮膚微小血管内皮細胞についての結果を図 6 に示す。

図から分かるように、H G F / N K 4 は 3 ng/ml b F
G F、10 ng/ml H G F、10 ng/ml V E G F 及び 5 % 血清
の刺激により促進された血管内皮細胞の増殖を、濃度依
存的に顕著に抑制した。このことから、H G F / N K 4
10 は、H G F 刺激で促進される血管内皮細胞の増殖のみならず、b F G F や V E G F などの他の血管内皮増殖促進因子による増殖に対しても、抑制的に作用することが示唆された。

15 実施例 8 - ヒト毛細血管内皮細胞に対する抗 H G F 抗体及び H G F / N K 4 の作用

A. 増殖に対する影響

抗 H G F 抗体及び H G F / N K 4 のヒト毛細血管内皮細胞の増殖に対する影響を調べた。

20 [方法]

培養したヒト皮膚毛細血管内皮細胞をリン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) にて洗浄後、トリプシン - E D T A

た。なお精度向上を図るため、細胞数の計測は、5視野をランダムに選択して各視野において行った。

[結果]

結果を図8に示す。図から分かるように、300nM HGF / NK 4は、3ng/ml bFGF、10ng/ml VEGF、3ng/ml HGFの刺激で促進された血管内皮細胞の遊走を顕著に抑制した。一方、10 μ g/mlの抗HGFウサギポリクローナル抗体は、HGF刺激による血管内皮細胞の遊走を特異的に抑制したが、bFGFやVEGF刺激による血管内皮細胞の遊走は抑制しなかった。このことから、HGF / NK 4がHGFアンタゴニスト作用に加えて、更に別の異なる新規な作用によって血管内皮細胞の遊走を抑制することが示唆された。

15 実施例9 - HGF / NK 4の鶏胚漿尿膜 (CAM) の血管新生抑制作用

鶏受精卵を4日間培養し、気室上部と鶏卵側部の2カ所の卵殻に穴をあけ、側部の穴から3ml卵白を吸引し、テープでシールした。気室上部の卵殻と卵殻膜を除去した、胚漿尿膜 (CAM) 上にシリコンリングの中心をあわせるように置き、シリコンリング内にHGF / NK 4または牛血清アルブミン (コントロール) を含むメチル

実施例 10 - HGF / NK 4 による腫瘍血管新生の抑制作用

6 ～ 8 週 齢 の ヌ ード マ ウ ス (B A L B / c n u / n u) 背 部 皮 下 に 5×10^6 個 の G B - d 1 ヒ ト 胆 の う 癌 細胞 を 移 植 し た 。 7 日 後 、 H G F / N K 4 ま た は コ ン ト ロ ール として 生 理 食 塩 水 を 含 む 浸 透 圧 ポ ン プ (Alzet 社 製) を 背 部 皮 下 に 埋 め 、 13 日 間 H G F / N K 4 ま た は 生 理 食 塩 水 を 持 続 的 に 移 植 癌 近 傍 に 注 入 し た 。 癌 移 植 4 週 間 後 、 癌 を 摘 出 し 、 固 定 後 通 常 の 組 織 切 片 を 作 成 し た 。 腫瘍 内 の 血 管 新 生 を 調 べ る た め 、 微 小 血 管 を 抗 von Willebrand factor 抗体 (Dako 社) を 用 い た 免 疫 組 織 化 学 法 に よ り 染 色 し た 。 結 果 を 表 2 に 示 す 。

表 2

15

<u>von Willebrand factor陽性度</u>	
HGF / NK 4	+
コントロール	++++

20 尚 お 腫 瘍 内 の 血 管 新 生 度 は 次 の 基 準 に 基 づ い て 評 価 し た

— : von Willebrand factor陽性を示す微小血管
 が認められない

請求の範囲

1. 下記の (a) 又は (b) に記載されるポリペプチド
を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

5 (a) Hepatocyte growth factor (HGF) の PyrGlu
 ^{3 2} ~ Val^{4 7 8} からなるアミノ酸配列を有するポリペ
 プチド、

 (b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複
 数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたア
10 ミノ酸配列からなり、かつ c-Met / HGF レ
 セプターを介する HGF の作用に対してアンタゴ
 ニスト活性を有するポリペプチド。

2 (補正後). 下記の (a) 又は (b) に記載されるポ
15 リペプチドを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

 (a) Hepatocyte growth factor (HGF) の PyrGlu
 ^{3 2} ~ Val^{4 7 8} からなるアミノ酸配列を有するポリペ
 プチド、

 (b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複
20 数のアミノ酸が欠失置換若しくは付加されたアミ
 ノ酸配列からなり、c-Met / HGF レセプター
 を介する HGF の作用に対するアンタゴニスト

活性、並びに b F G F 及び／又は V E G F に起因する血管内皮細胞の増殖を抑制する作用を有するポリペプチド。

5 3（補正後）．上記ポリペプチドが、少なくとも一つのヘアピンドメイン及び4つのクリングルドメインを有するものである請求項1又は2記載の血管新生抑制剤。

10 4（補正後）．上記ポリペプチドがHepatocyte growth factorをエラスターゼで消化して得られるものである請求項1又は2記載の血管新生抑制剤。

5（補正後）．配列番号1記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含有する血管新生抑制剤。

15

6（補正後）．配列番号2記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含有する血管新生抑制剤。

20 7（補正後）．請求項1又は2に記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含有する、血管異常増殖に起因する疾患の予防又は治療剤。

- 8 (補正後) . 血管異常増殖に起因する疾患が、リウマチ性関節炎、乾癬、オスラー-ウェバー (Osler-Webber) 症候群、心筋の脈管形成、末梢血管拡張症、血友病性関節症、眼の脈管形成性疾患、血管線維腫、良性腫瘍及び創傷肉芽形成よりなる群から選択されるいずれかである請求項 7 記載の予防又は治療剤。
- 9 (補正後) . 請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含有する、内皮細胞の過度な刺激によって生じる疾患の予防又は治療剤。
- 10 (補正後) . 内皮細胞の過度な刺激によって生じる疾患が、腸管癒着、クローン病、アテローム硬化症、強皮症及び過剰瘢痕形成よりなる群から選択されるいずれかである請求項 9 記載の予防又は治療剤。
- 11 (補正後) . 請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含有する受胎調節剤。
- 12 (補正後) . 下記 (a) 又は (b) に記載されるポリペプチド :
- (a) Hepatocyte growth factor (HGF) の PyrGlu

^{3 2} ~ Val^{4 7 8} からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c - M e t / H G F レセプターを介する H G F の作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド、

及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を被験者に投与することからなる、血管新生抑制方法。

10

13 (補正後) . 下記 (a) 又は (b) に記載されるポリペプチド :

(a) Hepatocyte growth factor (H G F) の PyrGlu^{3 2} ~ Val^{4 7 8} からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

15

(b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、c - M e t / H G F レセプターを介する H G F の作用に対するアンタゴニスト活性、並びに b F G F 及び / 又は V E G F に起因する血管内皮細胞の増殖を抑制する作用を有するポリペプチド、

20

及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を被験者に投与することからなる、血管新生抑制方法。

14 (補正後) . 下記(a)又は(b)に記載されるポリペプチド :

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) のPyrGlu³²~Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつc-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド、

及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を血管異常増殖に起因する疾患の予防または治療を受ける被験者に投与することからなる、該疾患の予防または治療方法。

15 (追加) . 下記(a)又は(b)に記載されるポリペプチド :

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) のPyrGlu³²~Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペ

プチド、

5 (b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、c-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対するアンタゴニスト活性、並びにbFGF及び／又はVEGFに起因する血管内皮細胞の増殖を抑制する作用を有するポリペプチド、

10 及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を血管異常増殖に起因する疾患の予防または治療をうける被験者に投与することからなる、該疾患の予防または治療方法。

16 (追加) . 上記疾患が、リウマチ性関節炎、乾癬、オスラー-ウェバー (Osler-Webber) 症候群、心筋の脈管形成、末梢血管拡張症、血友病性関節症、眼の脈管形成性疾患、血管線維腫、良性腫瘍、創傷肉芽形成、腸管癒着、クローン病、アテローム硬化症、強皮症及び過剰瘢痕形成よりなる群から選択されるいずれかである
20 請求項 14 又は 15 に記載の予防又は治療方法。

17 (追加) . 血管新生抑制剤の製造のための、下記

(a)又は(b)に記載されるポリペプチドの使用：

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) のPyrGlu³²～Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

5 (b) (a) のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつc-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド。

10

18 (追加) . 血管新生抑制剤の製造のための、下記

(a)又は(b)に記載されるポリペプチドの使用：

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) のPyrGlu³²～Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペ
15 プチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、c-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対するアンタゴニスト活性、並びにbFGF及び／又はVEGFに起因する血管内皮細胞の増殖を抑制する作用を有する
20 ポリペプチド。

09/674377

534 Rec'd PCT/PTO 30 OCT 2000

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below:

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified international application was filed, and that I believe the English translation of the international application No. PCT/JP99/01834 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Date

October 12, 2000

Full name of the translator Yumi KUJIME

Signature of the translator *Yumi Kujime*

Post Office Address Kitahama TNK Building 7-1, Dosho-machi

1-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-0045

Japan

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P99-10	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/01834	International filing date (day/month/year) 06 April 1999 (06.04.99)	Priority date (day/month/year) 28 April 1998 (28.04.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 38/18, A61P 29/00, 17/16, 9/10, 9/00, 35/00, 1/00, 17/00, 19/02		
Applicant NAKAMURA, Toshikazu		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 22 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

I ☒ Basis of the report

II ☐ Priority

III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

IV ☐ Lack of unity of invention

V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

VI ☐ Certain documents cited

VII ☐ Certain defects in the international application

VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 September 1999 (06.09.99)	Date of completion of this report 13 April 2000 (13.04.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01834

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-5,14-33,35-37,39,41-45, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages 6-13/1,34,38,40, filed with the letter of 07 February 2000 (07.02.2000)
- ☒ the claims:
pages 1, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 2-18, filed with the letter of 07 February 2000 (07.02.2000)
- ☒ the drawings:
pages 1-13, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1/8-8/8, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01834

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 12-16

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 12-16 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matters of claims 12-16 relate to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international preliminary examination by the International Preliminary Examining Authority in accordance with PCT Article 34(4)(a)(i) and Rule 67.1(iv).

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 12-16

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01834

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11,17,18	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-11,17,18	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11,17,18	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Date, K., et al., "HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor," FEBS Lett., 1997, Vol. 420, No. 1, pp. 1-6, full text
 Document 2: Bussolino, F., et al., "Hepatocyte Growth Factor Is a Potent Angiogenic Factor Which Stimulates Endothelial Cell Motility and Growth," J. Cell. Biol., 1992, Vol. 119, No. 3, pp. 629-641, Abstract, pp. 636-638: "In Vivo Angiogenic Effect of HGF"
 Document 3: Nishimura, M., et al., "Serum Hepatocyte Growth Factor as a Possible Indicator of Vascular Lesions," Rinsho Byori, 1997, Vol. 45, No. 9, pp. 831-836

Explanation

Document 1 discloses that a peptide having an amino acid sequence consisting of PyrGlu32~Val478 of HGF (hereafter called HGF/NK4) antagonizes and inhibits the bonding between HGF and its receptor, c-Met/HGF, and inhibits physiological activities such as mitogenic activity, motogen activity and morphogen activity of HGF (Abstract, Fig. 1, Fig. 3, 3.2 Receptor Analysis, and Discussion of document 1).

On the other hand, document 1 (Introduction), document 2 (Abstract) and document 3 (Abstract) discloses that HGF causes vascularization and stimulates endothelial cells. Considering the matter disclosed in document 1 that HGF/NK4 has a specific inhibiting activity to HGF, it is considered to be obvious for a person skilled in the art to use HGF/NK4 for inhibiting the vascularization derivation or endothelial cell activation caused by the intervention of HGF, and to apply a material with an effect to inhibit vascularization or endothelial cell activation to a particular disease such as rheumatic arthritis or intestinal adhesion which are closely involved in these phenomena.

However, as insisted by the applicant in the written reply, it is disclosed that HGF/NK4 inhibits, for example, the growth of vascular endothelial cells promoted not only by the action of HGF but also by VEGF and bFGF different from HGF in receptor (Example 8), having an effect which cannot be expected from the above documents. So, the present application is not obvious from the above documents.

Therefore, the subject matters of claims 1-11, 17 and 18 appear to involve an inventive step.
 The subject matters of claims 1-11, 17 and 18 appear to be industrially applicable.

suppress the neovascularization-inducing action of HGF.

The present invention has been developed on the basis of years of those studies on HGF.

The present invention, therefore, is directed to the following neovascularization inhibitors 1-5.

1. A neovascularization inhibitor comprising the following polypeptide (a) or (b) as an active ingredient.

(a) a polypeptide having the amino acid sequence PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ of hepatocyte growth factor.

(b) a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of (a) by the deletion, substitution or addition of one or more amino acids and having antagonistic activity against the c-Met/HGF receptor-mediated action of HGF.

2. A neovascularization inhibitor as set forth in paragraph 1 wherein said polypeptide has at least one hairpin domain and four Kringle domains.

3. A neovascularization inhibitor as set forth in paragraph 1 or 2 wherein said polypeptide is a polypeptide obtainable by digestion of hepatocyte growth factor with an elastase.

4. A neovascularization inhibitor comprising a

REPLACED BY 44734

polypeptide having the sequence of SEQ ID NO:1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

5. A neovascularization inhibitor comprising a polypeptide having the sequence of SEQ ID NO:2 and a pharmaceutically acceptable carrier.

The present invention is further directed to the following medically or pharmacologically useful agents 6-10.

6. A prophylactic or therapeutic agent for a disease associated with neovascularization which comprises the polypeptide set forth in paragraph 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

7. A prophylactic or therapeutic agent as set forth in paragraph 6 wherein said disease associated with vascular hyperplasia is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, psoriasis, Osler-Webber syndrome, myocardial angiogenesis, telangiectasia, hemophilic joint, angiogenic disease of the eye, angiofibroma, benign tumors and wound granulation.

8. A prophylactic or therapeutic agent for a disease arising from overstimulation of endothelial cells which comprises the polypeptide set forth in paragraph 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

9. A prophylactic or therapeutic agent as set forth under 8 wherein said disease arising from overstimulation of endothelial cells is selected from the group consisting of enteric adhesion, Crohn's disease, atherosclerosis, scleroderma and overcicatrization.

10. A conception-modulating agent comprising the polypeptide set forth in paragraph 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

The present invention is further directed to the following medically or pharmacologically useful treatment methods 11-13.

11. A method of inhibiting neovascularization which comprises administering to a subject a neovascularization inhibitor comprising the following polypeptide (a) or (b) and a pharmaceutically acceptable carrier:

(a) a polypeptide having the amino acid sequence PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ of hepatocyte growth factor (HGF)

(b) a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of (a) by the deletion, substitution or addition of one or more amino acids and having antagonistic activity against the c-Met/HGF receptor-mediated action of HGF.

12. A method for prophylaxis or therapy of a disease associated with neovascularization which comprises administering a neovascularization inhibitor comprising the following polypeptide (a) or (b) and a pharmaceutically acceptable carrier:

(a) a polypeptide having the amino acid sequence PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ of hepatocyte growth factor (HGF)

(b) a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of (a) by the deletion, substitution or addition of one or more amino acids and having antagonistic activity against the c-Met/HGF receptor-mediated action of HGF

to a subject in whom a prophylactic or therapeutic treatment for said disease is indicated.

13. A prophylactic or therapeutic method as set forth in paragraph 12 wherein said disease is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, psoriasis, Osler-Webber syndrome, myocardial angiopoiesis, telangiectasia, hemophilic joint, angiogenic disease of the eye, angiofibroma, benign tumors, wound granulation, enteric adhesion, Crohn's disease, atherosclerosis, scleroderma and overcirculation.

In a further aspect, the present invention is

directed to the use of the following polypeptide (a) or (b):

(a) a polypeptide having the amino acid sequence PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ of hepatocyte growth factor (HGF)

(b) a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence of (a) by the deletion, substitution or addition of one or more amino acids and having antagonistic activity against the c-Met/HGF receptor-mediated action of HGF for the production of a neovascularization inhibitor.

Representation of amino acids, peptides, nucleotide sequences and others by abbreviations in this specification is principally in conformity with the nomenclature recommended by IUPAC and IUPAC-IUB and the rules set forth in the "Guideline for Preparation of a Specification or the Equivalent Referring to a Nucleotide Sequence or an Amino Acid Sequence" (March 1997, The Examination Standards Office, Coordination Division, the Patent Office of Japan).

Furthermore, the amino acid numbers and positions as mentioned in this specification are based on the amino acid sequence of prepro-HGF (Nakamura T., et al., Nature 1989, 342, pp.440-443).

In the context of this invention, PyrGlu means pyroglutamate, which is a modified amino acid residue, and PyrGlu³² signifies that, based on the amino acid sequence of prepro-HGF, the 32nd amino acid residue from the N-terminus is pyroglutamate.

The neovascularization inhibitor (antineovascularization composition) of the present invention contains as an active ingredient a polypeptide resulting from the α -chain of HGF and having neovascularization inhibitory activity.

The term "resulting from the α -chain of HGF" is used herein to mean that the entire region or fragments of the α -chain of HGF are contained, whether continuously or discontinuously.

The term neovascularization inhibitory activity means any action that suppresses neovascularization without regard to its mode or mechanism but, in a preferred sense, means the action to suppress the neovascularization-inducing action of HGF.

As polypeptides having such activity, there can be mentioned polypeptides having an affinity for the c-Met/HGF receptor, which is the receptor of HGF, and the action to competitively antagonize the binding of HGF to said receptor. The preferred are

inhibits growth of vascular endothelial cells as induced by stimulation with 3 ng/ml bFGF, 10 ng/ml HGF, 10 ng/ml VEGF and 5% serum, respectively, all concentration-dependently and significantly.

These results suggested that HGF/NK4 acts in an inhibitory way not only against HGF-induced growth of vascular endothelial cells but also against the growth induced by other vascular endothelial cell growth factors such as bFGF and VEGF.

Example 9 Effects of anti-HGF antibody and HGF/NK4 on human capillary vessel endothelial cells

A. Influence on cell growth

The effects of anti-HGF antibody and HGF/NK4 on growth of human capillary vessel endothelial cells were evaluated.

Method

Cultured human skin capillary vessel endothelial cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and detached with trypsin-EDTA (phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% trypsin and 0.02% EDTA). These endothelial cells were suspended in EBM-2 medium (Clonetics) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), seeded on a gelatin-coated 24-well plate at a density of 5×10^3 cells/cm² and cultured for 24 hours.

cells stimulated by 3 ng/ml bFGF, 10 ng/ml VEGF or 3 ng/ml HGF. On the other hand, 10 μ g/ml anti-HGF rabbit polyclonal antibody specifically inhibited the HGF-stimulated migration of vascular endothelial cells but did not inhibit the bFGF or VEGF-stimulated migration of these cells. Those results suggested that, in addition to HGF-antagonizing activity, HGF/NK4 inhibits migration of vascular endothelial cells through some other novel activity.

Example 10 Inhibitory effect of HGF/NK4 on the neovascularization of chick chorioallantoic membrane (CAM)

Fertile chicken eggs were incubated for 4 days, after which the eggshell was drilled in two positions, namely over the air chamber and the lateral side of the shell. From the side hole, 3 ml of the egg white was aspirated and the shell was sealed with a tape. The shell and shell membrane over the air chamber were removed and a silicone ring was set centrally on the chorioallantoic membrane (CAM). Then, an HGF/NK4- or bovine serum albumin (control)-containing methylcellulose disk was set in the silicone ring. After 2 days of incubation at 37°C, the vasculature on the CAM was examined with

a stereoscopic microscope. The results are shown in Table 1.

Table 1

Degree of neovascular invasion	
HGF/NK4	+
Control	+++

The degree of neovascular invasion into the disk was evaluated on the following scale.

-: no invasion

+: about 1~2 invading vessels

++: about 3~4 invading vessels

+++: 5 or more invading vessels

The photographs of the findings obtained in the examination with a stereoscopic microscope, in lieu of a drawing, are presented in Fig. 9.

It will be apparent that whereas the control disk showed a marked neovascular invasion, the HGF/NK4 disk showed little evidence of neovascular invasion. This finding indicated that HGF/NK4 has neovascularization inhibitory activity.

Example 11 Inhibitory effect of HGF/NK4 on tumor neovascularization

Using 6~8-week-old nude mice (BALB/c nu/nu), 5×10^6 GB-d1 human gallbladder cancer cells were

CLAIMS

1. A neovascularization inhibitor comprising the following polypeptide (a) or (b) as an active ingredient:

(a) a polypeptide having the amino acid sequence PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ of hepatocyte growth factor (HGF).
(b) a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence defined in (a) by the deletion, substitution or addition of one or more amino acids and having antagonistic activity against the c-Met/HGF receptor-mediated action of HGF.

2. The neovascularization inhibitor according to Claim 1 wherein said polypeptide has at least one hairpin domain and 4 Kringle domains.

3. The neovascularization inhibitor according to Claim 1 wherein said polypeptide is one obtainable by elastase digestion of hepatocyte growth factor.

4. A neovascularization inhibitor comprising the polypeptide defined by SEQ ID NO:1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

5. A neovascularization inhibitor comprising the polypeptid defined by SEQ ID NO:2 and a

pharmaceutically acceptable carrier.

6. A prophylactic or therapeutic drug for a disease associated with abnormal angiopoiesis which comprises the polypeptide defined in Claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

7. The prophylactic or therapeutic drug according to Claim 6 wherein said disease associated with abnormal angiopoiesis is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, psoriasis, Osler-Webber syndrome, myocardial angiopoiesis, telangiectasia, hemophilic joint, angiogenic diseases of the eye, angiofibroma, benign tumors and wound granulation.

8. A prophylactic or therapeutic drug for a disease arising from overstimulation of endothelial cells which comprises the polypeptide defined in claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

9. The prophylactic or therapeutic drug according to Claim 8 wherein said disease arising from overstimulation of endothelial cells is selected from the group consisting of enteric adhesion, Crohn's disease, atherosclerosis, scleroderma and overcicatrizization.

10. A conception-regulating drug comprising th polypeptide defined in Claim 1 and a

pharmaceutically acceptable carrier.

11. A method of inhibiting neovascularization which comprises administering to a subject a neovascularization inhibitor comprising the following polypeptide (a) or (b) and a pharmaceutically acceptable carrier:

(a) a polypeptide having the amino acid sequence PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ of hepatocyte growth factor (HGF).

(b) a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence defined in (a) by the deletion, substitution or addition of one or more amino acids and having antagonistic activity against the c-Met/HGF receptor-mediated action of HGF.

12. A method for prophylaxis or therapy of a disease associated with abnormal angiopoiesis which comprises administering a neovascularization inhibitor comprising the following polypeptide (a) or (b) and a pharmaceutically acceptable carrier:

(a) a polypeptide having the amino acid sequence PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ of hepatocyte growth factor (HGF).

(b) a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence defined in (a) by the deletion, substitution or addition of one or more amino acids and having antagonistic activity

against the c-Met/HGF receptor-mediated action of HGF

to a subject in whom a prophylactic or therapeutic treatment for said disease is indicated.

13. The method for prophylaxis or therapy according to Claim 12 wherein said disease is any disease selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, psoriasis, Osler-Webber syndrome, myocardial angiopoiesis, telangiectasia, hemophilic joint, angiogenic diseases of the eye, angiofibroma, benign tumors, wound granulation, enteric adhesion, Crohn's disease, atherosclerosis, scleroderma and overcicatrizization.

14. Use of the following polypeptide (a) or (b) for the production of a neovascularization inhibitor:

(a) a polypeptide having the amino acid sequence $\text{PyrGlu}^{32} \sim \text{Val}^{478}$ of hepatocyte growth factor (HGF).

(b) a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence defined in (a) by the deletion, substitution or addition of one or more amino acids and having antagonistic activity against the c-Met/HGF receptor-mediated action of HGF.



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 38/18	A1	(11) 国際公開番号 WO99/55361 (43) 国際公開日 1999年11月4日(04.11.99)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01834</p> <p>(22) 国際出願日 1999年4月6日(06.04.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/134681 1998年4月28日(28.04.98) JP</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 中村敏一(NAKAMURA, Toshikazu)[JP/JP] 〒569-1020 大阪府高槻市高見台4-1 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NEOVASCULARIZATION INHIBITORS</p> <p>(54)発明の名称 血管新生抑制剤</p> <p>(57) Abstract Novel neovascularization inhibitory factors and neovascularization inhibitors useful in preventing and treating various diseases in association with neovascularization. These neovascularization inhibitors contain as the active ingredient polypeptides with the following definition (a) or (b): (a) a polypeptide having an amino acid sequence of PyrGlu³²-Val⁴⁷⁸ in HGF (hepatocyte growth factor); or (b) a polypeptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence as defined in (a) by deletion, substitution or addition of one or several amino acids and having an antagonism to the effect of HGF via c-Met-HGF receptor.</p>		

本発明は新規な血管新生抑制因子並びに血管新生に関わって生じる種々の疾患の予防及び治療に役立つ血管新生抑制剤を提供することを目的とする。すなわち、本発明は、下記 (a) 又は (b) に記載されるポリペプチドを有効成分として含有する血管新生抑制剤である：

(a) HGF (Hepatocyte growth factor) のPyrGlu^{3,2} ~ Val^{47,8}からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Met / HGF レセプターを介する HGF の作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴ
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ

DM ドミニカ
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサオ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮

KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア
共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル

RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シェラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴ
TJ タジキスタン
TZ タンザニア
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダード・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィエトナム
YU ユーゴスラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明細書

血管新生抑制剂

技術分野

5 本発明は、血管新生抑制剤に関する。より詳細には、
Hepatocyte growth factor（以下、単に HGF とも称す
る。）の α 鎖の特定領域を含む蛋白質を有効成分とする
血管新生抑制剤に関する。

本発明の血管新生抑制剤は、その血管新生抑制作用に
10 基づいて、血管異常増殖に起因する種々の疾患、例えば
リウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、老
人黄斑部変性、創傷治癒時の過剰瘢痕形成等の予防又は
治療剤として有用である。

背景技術

血管新生とは、何らかの刺激に応じて、主に細静脈の血管内皮細胞が反応して新しい血管網を形成する現象である。この現象は、生体の正常な状況下においては、組織の代謝を維持し、生体の機能的恒常性を保持するため
20 に不可欠であり、一般に損傷の治癒過程、胎児における肺の発育、黄体形成の進展形成等で観察される。

その一方、従来から異常な血管新生が炎症性疾患を含

む種々の疾患に関係していることが知られている。例えば、増殖性糖尿病、尋常性乾癬、リウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、老人黄斑部変性、創傷治癒時の過剰瘢痕形成等の疾患及び固形腫瘍の転移や再発は、血管、特に

5 末梢毛細血管の異常増殖に起因することが報告されている (Polverini P.J., Crit Rev Oral Biol Med., 1995, 6 (3), pp. 230-247, Review : Forkman J., Nature Med., 1995, 1(1), pp. 27-31)。

このため、これらの疾患に対する予防又は治療剤として、血管新生阻害作用を有する物質を有効成分とする種々の血管新生抑制剤が開発されている。

本発明は、新規な血管新生抑制因子を提供することを目的とするものである。さらに、本発明は上述するように血管の異常増殖に起因して生じる種々の疾患の予防及び治療に役立つ血管新生抑制剤を提供することを目的とするものである。

図面の簡単な説明

図 1 において、A は HGF のエラストーゼ処理物を逆相高速液体カラムクロマトグラフィー (逆相 HPLC) (C4) にかけて得られたクロマトグラムであり、B は逆相 HPLC の各ピーク画分を電気泳動 (還元条件、非

20

還元条件) に付した結果を示す図である。

図 2 は、H G F の α 鎖及び β 鎖の構造、並びにエラストーゼ処理により切り出される本発明の H G F の PyrGlu³² ~ Val⁴⁷⁸ 領域 (H G F / N K 4) の構造を模式的に示す図である。

図 3 において、A 及び B は、それぞれラット肝臓の原形質膜に対する ¹²⁵I - H G F 及び ¹²⁵I - H G F / N K 4 の用量依存的な結合を示す図である。なお、図 A 及び B 中の挿入図は、上記ラット肝臓の原形質膜に対する ¹²⁵I - H G F 及び ¹²⁵I - H G F / N K 4 の結合をそれぞれスキッチャードプロットで示した図である。C は、¹²⁵I - H G F 存在下で、ラット肝臓原形質膜に対する非標識 H G F 又は非標識 H G F / N K 4 の結合を調べた結果を示す図である (実施例 2 参照)。

図 4 は、H G F 及び H G F / N K 4 のマイトゲン活性の有無 (A)、並びに H G F のマイトゲン活性に対する H G F / N K 4 のアンタゴニスト作用を示す図である (B)。マイトゲン活性はラット初代培養肝細胞の D N A 合成を測定することによって調べた。具体的には、図 A は、H G F または H G F / N K 4 の存在下での肝細胞の D N A 合成を示し、図 B は 60 p M の H G F 又は 1.5 n M の表皮成長因子 (E G F) の存在下における肝細胞

胞のDNA合成に対するHGF/NK4の影響を見た図である（実施例3参照）。

図5は、bFGF、HGF若しくはVEGFの存在下又は非存在下（None）におけるHGF/NK4によるヒト肺微小血管内皮細胞の増殖抑制作用を調べた結果を示す図である（実施例7参照）。

図6は、bFGF、HGF若しくはVEGFの存在下又は非存在下（None）におけるHGF/NK4によるヒト皮膚微小血管内皮細胞の増殖抑制作用を調べた結果を示す図である（実施例7参照）。

図7は、HGF/NK4（図中、NK4として表示）及び抗HGF抗体（図中、 α -HGF Abとして表示）のヒト毛細血管内皮細胞の増殖に対する影響を5%ウシ胎児血清（FBS）、5%FBS+bFGF、5%FBS+VEGFまたは5%FBS+HGFの存在下で調べた結果を示す図である（実施例9A参照）。

図8は、HGF/NK4（図中、NK4として表示）及び抗HGF抗体（図中、 α -HGF Abとして表示）のヒト毛細血管内皮細胞の遊走に対する影響を1%ウシ胎児血清（FBS）、1%FBS+bFGF、1%FBS+VEGFまたは1%FBS+HGFの存在下で調べた結果を示す図である（実施例9B参照）。

図 9 は、H G F / N K 4 による鶏胚漿尿膜の血管新生抑制作用を実体顕微鏡による観察により調べた結果を示す、図面にかわる写真である。

図 1 0 は、H G F / N K 4 による腫瘍血管新生抑制作用を免疫組織化学法によって調べた結果を示す、図面にかわる写真である。

図 1 1 は、H G F / N K 4 がLewis肺癌細胞の成長を抑制する作用を有することを示す図面である。A は移植癌の体積を経時的に追跡した図であり、B は移植癌の 2 8 日目の重量を示す図である。

図 1 2 中、A は H G F / N K 4 が Lewis 肺癌細胞の転移を抑制する作用を有することを示す図面である（参考例 1 参照）。B は肺に転移した癌組織を示す図面に代わる写真であり、生理食塩水を注入したコントロール群は明らかに複数の肺転移巣があるのに対して、H G F / N K 4 投与群は肺転移巣がほとんどないことを示す。

図 1 3 は、H G F / N K 4 が J y g 乳癌細胞の成長（A）及び転移（B）を抑制する作用を有することを示す図面である。A は移植癌の体積を経時的に追跡した図であり、B は転移巣の数を示す図である。

本発明者らは、上記目的に基づいて新規な血管新生抑制因子を求めて日夜研究を重ねていたところ、Hepatocyte growth factor (HGF) の α 鎖の特定領域を含む蛋白質に血管の新生を有意に抑制する作用があることを見
5 いだして本発明を開発するに至った。

HGF は、そもそも本発明者によって 1984 年に肝実質細胞の新規増殖因子として見いだされたポリペプチドである (Nakamura T., et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 1984, 122, pp. 1450-1459)。本発明者のその後
10 の研究によって、HGF は分子量約 69 kDa の α 鎖と約 34 kDa の β 鎖からなるヘテロダイマーであり、しかもその構造は、 α 鎖に N 末端ヘアピンドメインと 4 つのクリングルドメインを有し、また β 鎖にセリンプロテアーゼ様ドメインを有するユニークなドメイン構造である
15 ことがわかった (Nakamura T., et al., *Nature* 1989, 3 42, pp. 440-443)。HGF の発見当初は肝再生因子の本体として肝細胞に特異性の高い増殖因子であると考えられていたが、リコンビナント HGF が使用できるようになった 1989 年以降の研究により、等がいう HGF は肝
20 細胞以外にも多くの上皮細胞に対して強力なマイトゲンとして働くことが明らかになった (Nakamura T., Prince ss Takamatsu Symp., 1994, 24, pp. 195-213. Review)。ま

た、更なる研究によって H G F はかかる細胞増殖制御に加えて、細胞運動 (cell motility) を促進するモートゲン (motogen) としての機能 (T. Nakamura, Prog. growth Factor Res., 3, pp. 67-85, 1991) や、多くの癌細胞の増殖を抑制する tumor suppressor 作用などの新しい生物活性を有することがわかった (Higashio K, et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 1990, July 16, 170(1), pp. 397-404)。

さらに 1991 年には、H G F の高親和性で機能的なレセプターが、プロトオンコジーン産物 (c - m e t 産物 : c - M e t) であることが明らかとなり (Bottaro D P, et al., *Science*, 1991, Feb., 15, 251(4995), pp. 802-804 : Naldini L, et al., *Oncogene*, 1991 Apr, 6(4), pp. 501-504)。本発明者は、 α 鎖内の N 末端ヘアピンならびに第 1、第 2 クリングルドメインが該 c - M e t / H G F レセプターに結合する最小ドメインであることを見いだした (Matsumoto K, et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 1991 Dec., 16, 181(2), pp. 691-699)。

本発明者はかかる H G F に関する一連の研究成果をさらに追究すべく研究を行っていたところ、本発明に先だち α 鎖内の N 末端ヘアピンならびに第 1 から第 4 の 4 つのクリングルドメインを有するポリペプチドが、上記 c

- M e t / H G F レセプターを介する H G F の作用に対してアンタゴニスト活性を有していることを新たに見だし、かかるポリペプチドが H G F の血管新生作用を有意に抑制する作用を有することを確認した。

- 5 本発明は、このような年余にわたる H G F の研究を基礎として上記新規な知見に基づいてなされたものである。

すなわち、本発明は下記 1 ～ 5 に掲げる血管新生抑制剤である。

- 10 1. 以下の (a) 又は (b) に記載されるポリペプチドを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

(a) Hepatocyte growth factor の P y r G l u ^{3 2} ~ V a l ^{4 7 8} からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

- 15 (b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c - M e t / H G F レセプターを介する H G F の作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド。

- 20 2. 上記ポリペプチドが、少なくとも一つのヘアピンドメイン及び 4 つのクリングルドメインを有するものである 1 記載の血管新生抑制剤。

3. 上記ポリペプチドが Hepatocyte growth factor をエ

ラスターゼで消化して得られるものである 1 又は 2 記載の血管新生抑制剤。

4. 配列番号 1 記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含有する血管新生抑制剤。

5 5. 配列番号 2 記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含有する血管新生抑制剤。

また本発明は、下記 6 ～ 10 に掲げる、医学的若しくは薬理学的に有用な医薬品である。

10 6. 上記 1 記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含有する、血管異常増殖に起因する疾患の予防又は治療剤。

7. 血管異常増殖に起因する疾患が、リウマチ性関節炎、乾癬、オスラー-ウェバー (Osler-Webber) 症候群、心筋の脈管形成、末梢血管拡張症、血友病性関節症、眼
15 の脈管形成性疾患、血管線維腫、良性腫瘍及び創傷肉芽形成よりなる群から選択されるいずれかである上記 6 記載の予防又は治療剤。

8. 1 記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含有する、内皮細胞の過度な刺激によって生じる疾患
20 の予防又は治療剤。

9. 内皮細胞の過度な刺激によって生じる疾患が、腸管癒着、クローン病、アテローム硬化症、強皮症及び過

剩癒痕形成よりなる群から選択されるいずれかである

8 記載の予防又は治療剤。

10 請求項1記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む受胎調節剤。

5 更にまた本発明は、下記11～13に掲げる、医学的若しくは薬理学的に有用な処置方法である。

11 下記(a)又は(b)に記載されるポリペプチド：

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) のPyrGlu³²～Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペ
10 プチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたア
ミノ酸配列からなり、かつc-Met/HGFレ
セプターを介するHGFの作用に対してアンタゴ
15 ニスト活性を有するポリペプチド

及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を被験者に投与することからなる、血管新生抑制方法。

12 下記(a)又は(b)に記載されるポリペプチド：

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) のPyrGlu³²～Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペ
20 プチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1若しくは複

数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Met / HGF レセプターを介する HGF の作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド

5 及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を血管異常増殖に起因する疾患の予防または治療をうける被験者に投与することからなる、該疾患の予防または治療方法。

1 3. 上記疾患が、リウマチ性関節炎、乾癬、オスラー
10 -ウェバー (Osler-Webber) 症候群、心筋の脈管形成、末梢血管拡張症、血友病性関節症、眼の脈管形成性疾患、血管線維腫、良性腫瘍、創傷肉芽形成、腸管癒着、クローン病、アテローム硬化症、強皮症及び過剰瘢痕形成よりなる群から選択されるいずれかである上記 12
15 記載の予防又は治療方法。

また、本発明は血管新生抑制剤の製造のための、下記 (a) 又は (b) に記載されるポリペプチドの使用に関する

:

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) の PyrGlu
20 ³² ~ Val⁴⁷⁸ からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複

数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつc-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド。

5

なお、本明細書において、アミノ酸、ペプチド、塩基配列その他に関する略号による表示は、基本的にはIUPAC及びIUPAC-IUBによる命名法又はその規定、及び「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」（平成9年3月、特許庁調整課審査基準室）に従うものとする。

また、本発明において、アミノ酸番号やアミノ酸の位置は、プレプロHGFのアミノ酸配列を基準として表記する（Nakamura T., et al., *Nature* 1989, 342, pp. 440-443）。本発明で、PyrGluとは、修飾アミノ酸であるピログルタメート（pyroglutamate）を意味し、PyrGlu³²とは、プレプロHGFのアミノ酸配列を基準としてN末端から32番目のアミノ酸残基が、ピログルタメートになっていることを示す。

20

本発明の血管新生抑制剤は、HGFの α 鎖に起因するものであって血管新生抑制作用を有するポリペプチドを

有効成分として含有するものである。

ここで「HGFの α 鎖に起因する」とは、HGFの α 鎖の全領域又はその断片を連続的もしくは非連続的に有するという意味で用いられる。

- 5 血管新生抑制作用とは、血管の新生作用を抑制する作用であればその機序の別を問うものではないが、好適にはHGFが有する血管新生作用を抑制する作用を意味する。

- かかる作用を有するポリペプチドとしては、HGFの
10 レセプターであるc-Met/HGFレセプターに親和性を有し、該レセプターへのHGFの結合を競合的に阻害する作用を有するものを挙げることができる。好適には、c-Met/HGFレセプターに結合して、c-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対して
15 アンタゴニスト活性を有するポリペプチドである。

- c-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用としては、c-Met/HGFレセプターのチロシンリン酸化作用、モートゲン活性(motogenic activity)、マイトゲン活性(mitogenic activity)及びモルフォゲン
20 ン活性(morphogenic activity)を挙げることができる(実験医学, Vol. 11, No. 9 (1993)参照)。

従って、本発明で用いられるポリペプチドとしては、

- これらの作用のいずれかを抑制・阻害するもの、具体的にはHGF誘導によるc-Met/HGFレセプターのチロシンリン酸化を抑制・阻害する作用、HGFが有するモートゲン活性を抑制・阻害する作用、HGFが有するマイトゲン活性を抑制・阻害する作用、またはHGFが有するモルフォゲン活性を抑制・阻害する作用のいずれか少なくとも1種を有するものが挙げられる。好ましくは、上記すべての作用を有するポリペプチドを挙げることができる。
- 10 このようなポリペプチドとしては、好適にはHGFのPyrGlu³²~Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、具体的には配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを挙げることもできる。尚、配列番号1中、「Xaa」とは「PyrGlu」を意味する。
- 15 当該ポリペプチドは、基本的にはHGFをエラストラーゼ処理することによって得られ、HGFの α 鎖のN末端領域の447アミノ酸から構成される。このため、当該ポリペプチドは、HGFの α 鎖と同様にN末端アミノ酸として修飾アミノ酸残基：ピログルタメートを有し、一
- 20 つのN末端ヘアピンドメインと4つのクリングルドメインを有している。なお、本発明において当該ポリペプチドをHGF/NK4とも称する。

後述する実施例で示すように、当該ポリペプチドは、
c-Met / HGF レセプターに HGF と競合的に結合
するアンタゴニスト活性をもち、HGF が誘導する c-
Met / HGF レセプターの自動チロシンリン酸化を抑
5 制・阻害する作用を有している。また当該ポリペプチド
は、それ自身はマイトゲン活性、モートゲン活性及びモ
ルフォゲン活性を殆ど有しておらず、HGF が有するマ
イトゲン活性、モートゲン活性及びモルフォゲン活性を
阻害する性質を有している。

10 しかしながら、前述するように本発明の血管新生抑制
剤の有効成分として用いられるポリペプチドは、HGF
の α 鎖に起因するものであって、HGF が有する血管新
生作用を抑制する作用を有するものであれば、上記配列
番号 1 で示される特定のポリペプチドに限定されること
15 はない。

かかるポリペプチドとしては、具体的には、HGF の
PyrGlu^{3,2} ~ Val^{4,7,8} からなるアミノ酸配列において、その
一部若しくは数個乃至は複数のアミノ酸が欠失、置換若
しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドで
20 あって、かつ c-Met / HGF レセプターを介する H
GF の作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペ
プチドを挙げることができる。

より好適には前述する H G F / N K 4 と同じか若しくは同程度の生理活性（チロシンリン酸化抑制作用、モートゲン活性抑制作用、マイトゲン活性抑制作用、モルフォゲン活性抑制作用）を有するポリペプチドを挙げることができる。

ここでアミノ酸の「欠失、置換若しくは付加」の程度およびそれらの位置等は、改変されたポリペプチドが上記生理活性を有するものであれば特に制限されない。例えば、上記 H G F / N K 4 の N 末端及び／又は C 末端において 1 若しくは複数（又は数個）のアミノ酸が欠失又は付加したポリペプチド、H G F / N K 4 の中央領域において 1 若しくは複数（又は数個）のアミノ酸が欠失又は付加したポリペプチドを挙げることができるが、H G F / N K 4 の特徴的な構造である少なくとも一つのヘアピンドメイン及び 4 つのクリングルドメインが実質上保持されるような改変であることが望ましい。

ゆえに改変ペプチドとして、好適にはヘアピンドメイン及び 4 つのクリングルドメイン以外の領域において 1 若しくは複数（又は数個）のアミノ酸が置換、欠失又は付加したポリペプチドを例示することができる。かかるポリペプチドとして、具体的には、H G F / N K 4 のポリペプチドのうちアミノ酸番号 1 6 2 ~ 1 6 6（配列番

号 1 において、アミノ酸番号 1 3 1 ~ 1 3 5) の 5 つの
アミノ酸が欠失したポリペプチド (H G F / N K 4 (del
5)) 、具体的には配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有す
るポリペプチドを挙げることができる。

5 本発明で用いられる H G F / N K 4 又は H G F / N K
4 (del 5) は、それぞれ配列番号 1 又は 2 に示すアミノ酸
配列又は既に公知の H G F の遺伝子配列等に基づいて、
慣用のペプチド合成に準じて化学的に製造するか又は遺
伝子工学的に製造することができる。

10 好適には H G F を酵素的に分解することによって得る
ことができる。

H G F の酵素分解は、例えばエラスターゼ等の酵素を
用いて H G F を消化することにより行うことができる。

次いで、高速液体クロマトグラフィーや S D S - P A G

15 E 等の慣用の蛋白精製法を用いて酵素消化物を精製し、
所定の分子量を有するポリペプチドを単離することによ
り、H G F / N K 4 を取得することができる。ここで分
子量としては、S D S - P A G E の還元条件下で約 6 5
~ 6 9 k D 、好ましくは約 6 7 k D を挙げることができ、
20 また S D S - P A G E の非還元条件下で約 4 8 ~ 5 2 k
D 、好ましくは約 5 0 k D の分子量を挙げることができ
る。

なお、酵素分解に用いられる H G F は、その取得の由来及び調製法等によって特に制限されるものではない。

- 例えば、ヒトを含む哺乳動物の肝臓などの組織、血小板や白血球などの血液細胞又は血漿や血清などから抽出、
- 5 精製することによって得ることができるし (FEBS, 224, 312, (1987); Proc. Acad. Sci. USA, 86, 5844, (1989))、また H G F を産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物から分離、精製することによって得ることができる。
- また、遺伝子工学的手法により H G F をコードする遺伝子
- 10 子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞 (例えば、動物細胞) に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換え H G F を得ることもできる (例えば、Nature, 342, 440, 1989; 特開平 5 - 1 1 1 3 8 3 号公報; 特開平 3 - 2 5 5 0 9 6 号公報;
- 15 Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967, 1989等)。H G F をコードする遺伝子としては、通常ヒトを含む哺乳動物に由来する H G F 遺伝子、好ましくはヒトに由来する H G F 遺伝子、より好ましくはヒトに由来する組換え H G F 遺伝子 (特開平 5 - 1 1 1 3 8 3 号公報) を用いる
- 20 ことができる。

また H G F / N K 4 (del15) のように、H G F / N K 4 のアミノ酸配列に基づいて改変されてなるいわゆる改変

体は、ペプチド合成法により化学的に調製してもよく、またHGFの遺伝子に基づいて遺伝子工学的改変法で調製することもできる。

遺伝子工学的改変法としては、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス〔Methods in Enzymology, 154: 350, pp.367-382 (1987); 同 100: 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12: 9441 (1984); 続生化学実験講座 1「遺伝子研究法II」、日本生化学会編, p105 (1986)〕等の遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法等の化学合成手段〔J. Am. Chem. Soc., 89: 4801 (1967); 同91: 3350 (1969); Science, 150: 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22: 1859 (1981); 同24: 245 (1983)〕及びそれらの組合せ方法等が例示できる。

本発明の血管新生抑制剤は、その投与剤形を特に制限するものではなく、例えば散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、乳剤、懸濁剤又はシロップ剤等の経口剤；軟膏、クリーム、貼付剤、坐剤等の外用剤；点眼剤、眼軟膏等の眼用剤；注射剤、点滴などの種々の製剤形態をとり得る。これらの投与剤は、この分野で通常知られた慣用的な製剤方法により製剤化される。

錠剤の形態に成形するに際しては、担体として例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプ

ン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を使用できる。更に錠剤は必要に応じて通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠等とすることができる。

丸剤の形態に成形するに際しては、担体として例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルクなどの賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン等の結合剤、ラミナラン、カンテンな

どの崩壊剤等を使用できる。

カプセル剤は常法に従い、上記ペプチドを上記で例示した各種の担体と混合して硬化ゼラチンカプセル、軟質カプセル等に充填して調製される。

- 5 坐剤の形態に成形するに際しては、担体として例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセライド等が使用できる。

- 10 注射剤は常法に従って調製することができ、例えば上記ポリペプチドを適切な溶媒に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することによって調製することができる。なお、注射液は血液と等張であるのが好ましく、これらの形態に成形するに際しては、希釈剤として例えば滅菌水、エチルアルコール、15 マクロゴール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を使用できる。なお、この場合等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖あるいはグリセリンを医薬製剤中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を添加してもよい。
- 20

軟膏剤を調製する場合は、上記ペプチドに通常使用さ

れる基剤、安定化剤、潤滑剤、保存剤等が必要に応じて配合され、常法により混合、製剤化される。基剤としては流動パラフィン、白色ワセリン、サラシミツロウ、パラフィン等が挙げられる。保存剤としてはパラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等が挙げられる。

貼付剤を製造する場合には、通常的支持体に前記軟膏、ペースト、クリーム、ゲル等を常法により塗布すればよい。支持体としては綿、スフ、化学繊維からなる織布、不織布や軟質塩化ビニル、ポリエチレン、ポリウレタン等のフィルムあるいは発泡体シートが適当である。

更に上記各製剤には、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等の薬学的に許容される添加剤や他の医薬品を含有させてもよい。

製剤化に際しては、安定化剤を配合することが好ましい。安定化剤としては例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコール等を挙げることができる。

また、注射剤等の液剤とする場合は、凍結保存するか、または予め凍結乾燥品として調製することが好ましい。凍結乾燥品は、用時に注射用蒸留水等により再溶解して使用される。

本発明の製剤中に含有されるべきポリペプチドの量としては、特に限定されず広範囲に適宜選択されるが、通常製剤中 0.0002 ~ 0.2 (w/v %) 程度、好ましくは 0.001 ~ 0.1 (w/v %) 程度とするのがよい。

上記医薬製剤の投与方法は特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別、その他の条件、疾患の程度等に応じて適宜決定される。例えば、注射剤は単独であるいはブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じて単独で筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与される。

本発明の血管新生抑制剤の1日当りの投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり一概に決定できないが、本発明のポリペプチド (HGF/NK4 またはその改変体) として通常成人1日当たり約 0.01 ~ 100 mg とすればよく、これを1回又は数回に分けて投与するのが好ましい。

本発明の血管新生抑制剤は、血管異常増殖に起因する疾患の予防又は治療に広く適用することができる。かかる疾患としては、特に制限はないが、具体的には、例えばリウマチ性関節炎、乾癬、オスラー-ウェバー (Osler-Webber) 症候群、心筋の脈管形成、末梢血管拡張症、血

友病性関節症、眼の脈管形成性疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、老人黄斑部変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症又はルペオオーシス等）、血管線維腫、良性腫瘍（例えば、血管種、聴神経腫、神経線維種、トラコーマ、化膿性肉芽腫等）、白血病を含む造血器腫瘍、固形腫瘍、腫瘍転移、創傷肉芽形成等を挙げることができる。

本発明の血管新生抑制剤は、また内皮細胞の過度若しくは異常な刺激によって生じる疾患の予防又は治療に広く適用することができる。かかる疾患としては、特に制限はないが、具体的には、例えば腸管癒着、クローン病、アテローム硬化症、強皮症、例えばケロイド等の過剰瘢痕形成等を挙げることができる。

本発明の血管新生抑制剤は、さらに胚着床に必要な血管新生を妨げることに基づく受胎調節剤として有用であり、また病的な結果としてネコのひっかき疾患（cat scratch disease）や潰瘍といった脈管形成を伴う疾患の予防剤又は治療剤として有用である。

20

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の説明のために実施例を記載するが、当

該実施例はなんら本発明の技術的範囲を制限するものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらはいずれも本発明の技術的範囲に含まれる。

5

実施例 1 HGF / NK 4 の単離精製

ヒト HGF cDNA で形質転換した CHO 細胞を培養して、該培養物からヒト遺伝子組換え HGF を精製単離した (Nature 342, pp. 440-443 (1989); Biochem. Biophys. Res. Commun. 172, pp. 321-327 (1990))。次いで該組換え HGF (900 mg) を 0.2 M トリス / 塩酸緩衝液 (pH 8.8) 中で 37℃、20 分間、膵臓エラスターゼ (Sigma 社製) (酵素 : 基質 = 1 : 100) で消化し、該消化物を逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC : μ Bondapak C4 カラム使用、日本ウォーターズ社製) に付して、0.05% トリフルオロ酢酸を含有するアセトニトリルのグラジェントによって溶出し、精製した。図 1 A に示すように、HPLC により 3 つのピークが得られた。

20 次いで、これらの各ピーク画分を SAS-PAGE にかけて、タンパク染色を行った (図 1 B)。それにより、第一のピークが非還元条件下で 50 kD、還元条件下で

67 kD の分子量を有するポリペプチドのフラグメントであり、第二のピークが69 kD の α 鎖及び34 / 32 kD の β 鎖からなる未消化のヘテロダイマー HGF に相当し、第三のピークが非還元条件下で33 / 31 kD ,
5 及び還元条件下で34 / 32 kD 分子量を有するフラグメントであることがわかった。

なお上記において、__ / __ kD とは、アミノ酸配列は同一であるが、付加している糖鎖の違いに基づいて、分子量の異なる蛋白質が存在することを示す。

10 このことは、HGF をエラスターゼ処理することによって、 α 鎖の大部分を有するが α 鎖全体よりもわずかに小さいフラグメント（第一ピーク）と、 α 鎖の C 末端側の一部と完全な β 鎖とからなるフラグメント（第三ピーク）との2つに消化されることが分かった。

15 精製フラグメントについてアミノ酸配列を分析するために、まず各溶出画分から溶媒を蒸発して、残渣を0.05% CHAPS (Sigma社製) 及び1M NaCl を含む0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.3) に溶解した。アミノ酸分析は、自動プロテインシーケンサー モデル
20 492 (Applied Biosystem Inc. 社製) を用いて行った。

まず第一ピークのフラグメントのN末端アミノ酸分析を行ったが、うまくいかなかったため、HGF のN末端と

同様に該フラグメントのN末端はピログルタメートになっている可能性が示唆された。そこで、該フラグメントをピログルタメートアミノペプチダーゼで処理してN末端アミノ酸分析を行ったところ、その配列は一文字表記
5 でR K R R N T I H E Fであり、 α 鎖の2～11番目のN末端アミノ酸配列と一致した。このことから、該フラグメントのN末端アミノ酸はピログルタメートに修飾されたグルタミンであり、N末端領域の構造は未消化のH G Fと同じであることが判明した。

10 次に、当該フラグメントのC末端を分析するために、エラスターゼ消化によって生じた他のフラグメント（第三ピーク）について、それが有する部分 α 鎖のN末端をアミノ酸分析した。その結果、該部分 α 鎖のN末端領域のアミノ酸配列はH G FのA s n⁴⁷⁹ - A l a⁴⁸⁸に相当
15 することがわかった。これから、第一ピークフラグメントのC末端はV a l⁴⁷⁸であることが判明した。

以上の結果から、H G Fをエラスターゼ処理することによって、2つのフラグメントに消化され、その一つはH G Fのヘアピンドメインと4つのクリングルドメイン
20 を有するPyrGlu³²～V a l⁴⁷⁸の領域からなるフラグメント（H G F / N K 4）であり、他の一つは α 鎖の一部（A s n⁴⁷⁹から始まる16アミノ酸）と β 鎖とからなる

フラグメントであることが明らかになった（図 2）。

実施例 2 - HGF / NK 4 の細胞表面レセプターとの結合性

5 実施例 1 で調製した HGF / NK 4 について、細胞表面レセプターとの結合性を調べた。また比較実験として、HGF を用いて同様に細胞表面レセプターとの結合性を調べた。なお、HGF / NK 4 及び HGF はクロラミン-T 法によって放射性標識し（ ^{125}I - HGF / NK 4、
10 ^{125}I - HGF）、また細胞表面レセプター標品としてラット肝臓から調製した原形質膜を用いた。

スキャッチャード分析により、HGF 及び HGF / NK 4 はいずれも 80 pM まで、濃度依存的に細胞表面レセプターと結合することがわかり（図 3 A 及び B）、H
15 GF レセプターの K_d 及び数はそれぞれ 64.5 pM 及び 5478 部位 / ng であり、また HGF / NK 4 レセプターの K_d 及び数はそれぞれ 486 pM 及び 6427 部位 / ng であった。

次いで HGF / NK 4 が HGF に対する競合的なアン
20 タゴニストであるか否かを調べるために、肝臓の原形質膜（50 μg ）を ^{125}I - HGF 単独（60 pM）、または ^{125}I - HGF に種々の濃度の非標識 HGF 若しくは非

標識 H G F / N K 4 を加えて、それらの存在下でインキュベーションを行った。 ^{125}I - H G F の膜結合は、非標識 H G F の添加によって完全に阻害され、非標識 H G F による 50 % 阻害濃度は 60 p M であった。非標識 H G F / N K 4 もまた同様に ^{125}I - H G F の膜結合を阻害し、H G F / N K 4 による 50 % 阻害濃度は 600 p M であり、60 n M で完全に ^{125}I - H G F の膜結合を阻害した (図 3 C)。

このことから、H G F / N K 4 は、c - M e t / H G F レセプターに対して、H G F より 8 ~ 10 倍低いものの親和性を有しており、H G F のアンタゴニストであることが示唆された。

実施例 3 - H G F / N K 4 のマイトゲン活性及び H G F のマイトゲン活性に対する阻害作用

ラット初代培養肝細胞の D N A 合成を測定することにより、H G F / N K 4 のマイトゲン活性を調べた。また、比較対象実験として、同様に H G F のマイトゲン活性を測定した (Nature 342, 440-443 (1989); Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 691-699 (1991))。

結果を図 4 A に示す。該図から分かるように、H G F は用量依存的に肝細胞の D N A 合成を促進するのに対し

て、HGF / NK 4 には 100 nM という高濃度でも DNA 合成を促進する効果はみられなかった。

一方、HGF を含有する培養液中に HGF / NK 4 を入れ、HGF と HGF / NK 4 を共存させた場合、HGF / NK 4 は用量依存的に HGF によって促進される DNA 合成を抑制し、60 nM でほぼ完全に阻害した (図 4 B)。それに対して、HGF / NK 4 は表皮成長因子 (EGF) によって促進される DNA 合成に対しては阻害作用を示さなかった (図 4 B)。

これらのことから、HGF / NK 4 は、それ自身マイトゲン活性を有しないが、HGF のマイトゲン活性を特異的に阻害する作用を有していることがわかる。

実施例 4 - HGF / NK 4 のマイトゲン活性及び HGF

15 のマイトゲン活性に対する阻害作用

腎尿細管由来の正常上皮細胞である MDCK 細胞を用いて HGF / NK 4 のマイトゲン活性を調べた。

MDCK 細胞は、HGF を含まないコントロール培地中では隙間なくコロニーを形成したが、HGF (22 pM) を培地に添加すると MDCK 細胞の運動性を亢進し、該細胞を分散させた。それに対して HGF / NK 4 は細胞を全く分散させず、細胞と細胞の接触性はよく維持さ

れていた。また、M D C K細胞をH G F及びH G F / N K 4の共存下で培養したところ、H G F / N K 4はH G Fによって誘導される細胞分散を阻害した。

5 これらのことから、H G F / N K 4は、それ自身モートゲン活性を有しないが、H G Fのモートゲン活性を阻害する作用を有していることがわかる。

実施例 5 - H G F / N K 4 のモルフォゲン活性及び H G F のモルフォゲン活性に対する阻害作用

10 H G F / N K 4 が、H G F の有するモルフォゲン活性を阻害するか否かを調べるために、腎尿細管由来の正常上皮細胞である M D C K 細胞を H G F 及び / 又は H G F / N K 4 の存在下、コラーゲンゲル中で生育させた。

15 M D C K 細胞は、H G F を含まないコントロール培地中では球状の細胞塊を形成したが、H G F (5 5 p M) を培地に添加すると枝分かれした管腔構造が誘導された。それに対して H G F / N K 4 (5 5 n M) を添加しても管腔構造は誘導されなかった。また、M D C K 細胞を H G F 及び H G F / N K 4 の共存下で培養すると、細胞は
20 細胞塊の状態を維持し、管腔構造は誘導されなかった。

これらのことから、H G F / N K 4 は、それ自身モルフォゲン活性を有しないが、H G F のモルフォゲン活性

を阻害する作用を有していることがわかる。

実施例 6 - HGF / NK 4 の、HGF が誘導する c - M
e t チロシンリン酸化の阻害作用

- 5 肺癌細胞 A 5 4 9 は、c - M e t / H G F レセプターを発現しており、H G F 刺激によって c - M e t のチロシンリン酸化が亢進することが知られている。そこで、H G F / N K 4 が該 H G F の c - M e t に対するチロシンリン酸化作用を阻害するかどうかを調べた。
- 10 具体的には、A 5 4 9 細胞を H G F 及び / 又は H G F / N K 4 で刺激して、細胞を可溶化させて、抗 c - M e t 抗体で免疫沈降させ、ウェスタンブロッティングを行って、抗ホスホチロシン抗体で c - M e t のチロシンリン酸化を観察した。
- 15 その結果、H G F (1 1 0 p M) による刺激によって c - M e t のチロシンリン酸化が誘導されたのに対して、H G F / N K 4 (1 1 0 n M) による刺激では殆どリン酸化されなかった。また、H G F / N K 4 は、H G F 誘導による c - M e t のチロシンリン酸化を用量依存的に
- 20 阻害した。

これらのことから、H G F / N K 4 は、H G F が誘導する c - M e t / H G F レセプターのチロシンリン酸化

を抑制することが分かる。また、この阻害作用に基づいてHGF/NK4はHGFの生物学上の活性に対してアンタゴニストとして作用すると考えられた。

5 実施例 7 - HGF/NK4の血管内皮細胞の増殖抑制作用

血管内皮細胞として、ヒト肺微小血管内皮細胞（HMVEC-L：Clonetics社）、ヒト皮膚微小血管内皮細胞（HMVEC-D：Clonetics社）を用いて、HGF/NK4の内皮細胞に対する増殖抑制作用をみた。

具体的には、Passage-5～8の対数増殖期のヒト肺微小血管内皮細胞またはヒト皮膚微小血管内皮細胞の細胞浮遊液を作成し、ゼラチンコートした24ウェルのプレートディッシュに1ウェルあたり8000個の細胞を播きこんだ。24時間後、新しい培養液（EGM（Eagle General Medium）とDMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）とを1：1で混合し、それに5%となるように血清を混合したもの）に交換し、3 ng/ml bFGF（basic Fibroblast Growth Factor）、10 ng/ml HGF、10 ng/ml VEGF（Vascular Endothelial Growth Factor）および何も添加しないもの（5%血清含有溶液、図中Noneで示す）の4つの群を設定し、それに0～450 nM範

囲の各濃度の HGF / NK 4 を添加して 37℃、5% CO₂ で培養した。72 時間後、トリプシンで細胞を剥がし、Coulter counter で細胞数を計測した。

5 ヒト肺微小血管内皮細胞についての結果を図 5 に、ヒト皮膚微小血管内皮細胞についての結果を図 6 に示す。

図から分かるように、HGF / NK 4 は 3 ng/ml bFGF、10ng/ml HGF、10ng/ml VEGF 及び 5% 血清の刺激により促進された血管内皮細胞の増殖を、濃度依存的に顕著に抑制した。このことから、HGF / NK 4
10 は、HGF 刺激で促進される血管内皮細胞の増殖のみならず、bFGF や VEGF などの他の血管内皮増殖促進因子による増殖に対しても、抑制的に作用することが示唆された。

15 実施例 9 - ヒト毛細血管内皮細胞に対する抗 HGF 抗体及び HGF / NK 4 の作用

A. 増殖に対する影響

抗 HGF 抗体及び HGF / NK 4 のヒト毛細血管内皮細胞の増殖に対する影響を調べた。

20 [方法]

培養したヒト皮膚毛細血管内皮細胞をリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) にて洗浄後、トリプシン - EDTA

(0.05%トリプシン及び0.02%EDTAを含むリン酸緩衝化生理食塩水(PBS))を用いて剥がした。得られた内皮細胞を5%ウシ胎児血清(FBS)を含むEBM-2培地(Clonetics社製)にて懸濁後、ゼラチンコートした24ウェルプレートに 5×10^3 細胞/cm²となるように播き、24時間培養した。

培養物を、5%FBS含有EBM-2培地をベースとする下記10種類の培地に応じて10群に分けて、培地をそれぞれ下記培地で交換した。なお、下記 α -HGF Abは抗HGFウサギポリクローナル抗体を示す。

1. 5% FBS
2. 5% FBS + 3ng/ml bFGF
3. 5% FBS + 3ng/ml bFGF + 300nM HGF/NK4
4. 5% FBS + 3ng/ml bFGF + 10 μ g/ml α -HGF Ab
- 15 5. 5% FBS + 10ng/ml VEGF
6. 5% FBS + 10ng/ml VEGF + 300nM HGF/NK4
7. 5% FBS + 10ng/ml VEGF + 10 μ g/ml α -HGF Ab
8. 5% FBS + 3ng/ml HGF
9. 5% FBS + 3ng/ml HGF + 300nM HGF/NK4
- 20 10. 5% FBS + 3ng/ml HGF + 10 μ g/ml α -HGF Ab

これらの培地を37℃、5%CO₂の条件下で72時間

培養し、次いでトリプシンで細胞を剥がし、Coulter counterで細胞数を計測した。

[結果]

結果を図7に示す。図から分かるように、300nM HGF / NK 4 は、3ng/ml bFGF、10ng/ml VEGF、3ng/ml HGF の刺激で促進された血管内皮細胞の増殖を顕著に抑制した。一方、10 μ g/mlの抗HGFウサギポリクローナル抗体は、HGF刺激による血管内皮細胞の増殖を特異的に抑制したが、bFGFやVEGF刺激による血管内皮細胞の増殖は抑制しなかった。このことから、HGF / NK 4 がHGF アンタゴニスト作用に加えて、更に別の異なる新規な作用によって血管内皮細胞の増殖を抑制することが示唆された。

15 B. 細胞遊走に対する影響

抗HGF抗体及びHGF / NK 4 のヒト毛細血管内皮細胞の遊走に対する影響を調べた。

[方法]

細胞遊走に対する影響は改良したボイデンチャンバ
20 法 (Yoshida A, et al, ;Growth Factors.1996;13(1-2):57-64) を用いて調べた。具体的には、13.4 μ g/ml のフィブロネクチンでコーティングしたポアサイズ5 μ

m のポリカーボネートフィルターを用いてボイデンチャ
ンバー法を行った。

まずヒト皮膚毛細血管内皮細胞を、血清を含まない E
B M - 2 培地にて 1 2 時間培養した後、1 % ウシ胎児血
5 清を含む E B M - 2 で懸濁し、上記フィルターに 1.2×10^4 細胞 / cm^2 となるように播いた。

該培養物を 10 群に分け、各培養物のフィルターカッ
プ外液に下記のように b F G F、H G F、V E G F また
は H G F / N K 4、抗 H G F ウサギポリクローナル抗体
10 (α - H G F A b) が含まれるように、各溶液を添加した。

1. 無添加 (1% FBS 含有 EBM-2 培地)
2. 3ng/ml bFGF
3. 3ng/ml bFGF + 300nM HGF/NK4
4. 3ng/ml bFGF + $10 \mu\text{g/ml}$ α - HGF A b
- 15 5. 10ng/ml VEGF
6. 10ng/ml VEGF + 300nM HGF/NK4
7. 10ng/ml VEGF + $10 \mu\text{g/ml}$ α - HGF A b
8. 3ng/ml HGF
9. 3ng/ml HGF + 300nM HGF/NK4
- 20 10. 3ng/ml HGF + $10 \mu\text{g/ml}$ α - HGF A b

これらを 5 時間培養し、顕微鏡下 ($\times 200$) で各フ
ィルターの下面に遊走した細胞数 (1 視野内) を計測し

た。なお精度向上を図るため、細胞数の計測は、5視野をランダムに選択して各視野において行った。

[結果]

結果を図8に示す。図から分かるように、300nM HGF / NK 4 は、3ng/ml bFGF、10ng/ml VEGF、3ng/ml HGF の刺激で促進された血管内皮細胞の遊走を顕著に抑制した。一方、10 μ g/mlの抗HGFウサギポリクローナル抗体は、HGF刺激による血管内皮細胞の遊走を特異的に抑制したが、bFGFやVEGF刺激による血管内皮細胞の遊走は抑制しなかった。このことから、HGF / NK 4 がHGF アンタゴニスト作用に加えて、更に別の異なる新規な作用によって血管内皮細胞の遊走を抑制することが示唆された。

15 実施例 10 - HGF / NK 4 の鶏胚漿尿膜 (CAM) の血管新生抑制作用

鶏受精卵を4日間培養し、気室上部と鶏卵側部の2カ所の卵殻に穴をあけ、側部の穴から3ml卵白を吸引し、テープでシールした。気室上部の卵殻と卵殻膜を除去した、胚漿尿膜 (CAM) 上にシリコンリングの中心をあわせるように置き、シリコンリング内にHGF / NK 4 または牛血清アルブミン (コントロール) を含むメチル

セルロースディスクを置いた。37℃で2日間培養した後、CAM上の血管網を実体顕微鏡下で観察した。結果を表1に示す。

表 1

5

新生血管の進入度	
HGF/NK4	+
コントロール	+++

なおディスク中への新生血管の進入度は次の基準に基づいて評価した

－：新生血管の進入が認められない

＋：1～2程度の新生血管の進入が認められる

++：3～4程度の新生血管の進入が認められる

+++：5以上の新生血管の進入が認められる

15 また、実体顕微鏡で観察した結果を図面に代わる写真（図9）として提出する。

これらからわかるように、コントロールのディスクでは、新生血管の進入を著しく認めたのに対して、HGF/NK4のディスクでは新生血管の進入が殆どなかった。

20 このことから、HGF/NK4に血管新生抑制作用があることが認められた。

実施例 11 - HGF / NK 4 による腫瘍血管新生の抑制作用

6 ~ 8 週齢のヌードマウス (BALB / c nu / nu) 背部皮下に 5×10^6 個の GB-d 1 ヒト胆のう癌細胞を移植した。7 日後、HGF / NK 4 またはコントロールとして生理食塩水を含む浸透圧ポンプ (Alzet 社製) を背部皮下に埋め、13 日間 HGF / NK 4 または生理食塩水を持続的に移植癌近傍に注入した。癌移植 4 週間後、癌を摘出し、固定後通常の組織切片を作成した。腫瘍内の血管新生を調べるため、微小血管を抗 von Willebrand factor 抗体 (Dako 社) を用いた免疫組織化学法により染色した。結果を表 2 に示す。

表 2

15

<u>von Willebrand factor 陽性度</u>	
HGF / NK 4	+
コントロール	++++

20 た

なお腫瘍内の血管新生度は次の基準に基づいて評価し

- : von Willebrand factor 陽性を示す微小血管が認められない

+ : 1 / 4 程度の微小血管が von Willebrand factor陽性を示す

+ + : 1 / 2 程度の微小血管が von Willebrand factor陽性を示す

5 + + + : 3 / 4 程度の微小血管が von Willebrand factor陽性を示す

+ + + + : 3 / 4 以上の微小血管が von Willebrand factor陽性を示す

また、顕微鏡で観察した結果を図面に代わる写真（図
10 10）として提示する。

これらの結果からわかるように、生理食塩水を注入したコントロールの移植癌組織内には von Willebrand factor陽性の微小血管が多数形成され、腫瘍組織内での癌細胞のアポトーシスは認められなかった。これに対して、
15 HGF / NK 4 を注入した移植癌組織では腫瘍血管新生は著しく抑制され、癌中心部では癌細胞のアポトーシスが広範囲に認められた。このことから、HGF / NK 4 は in vivo で腫瘍血管新生を抑制することが判明した。

20 参考例 1 - HGF / NK 4 による癌の成長・転移抑制効果（1）

6 ~ 8 週齢のヌードマウス（BALB / c nu / nu）背

部皮下に 5×10^6 個の Lewis 肺癌細胞を移植した。5 日後、HGF/NK4 又は生理食塩水（コントロール）を含む浸透圧ポンプ（Alzet 社製）を背部皮下に埋め、2 週間 HGF/NK4 又は生理食塩水を持続的に移植癌近傍に注入した。癌移植後 28 日後に移植癌の重量及び肺転移を調べた。癌の体積は（短径）² × （長径）² × 0.5 で算出した。

移植癌の体積を経時的に追跡した結果を図 11A に、図 11B に移植癌の 28 日目の重量を示す。図からわかるように、生理食塩水を注入したコントロールの移植癌は移植後 10 日以降急速に成長したが、HGF/NK4 は癌の成長を用量依存的に強く抑制した。

また、Lewis 肺癌の肺転移に関しては、コントロールの生理食塩水注入群では多数の肺転移巣が観察されたのに対して、HGF/NK4 を注入した個体では肺転移は用量依存的に強く阻害された（図 12A、B）。

これらのことから、HGF/NK4 は、in vivo で肺癌の成長及び転移を有意に抑制する作用を有していることがわかる。

20

参考例 2 - HGF/NK4 による癌の成長・転移抑制効果 (2)

6 ~ 8 週 齡 の ヌ ード マ ウ ス (B A L B / c nu / nu) 背
部 皮 下 に 5×10^6 個 の Jyg 乳 癌 細 胞 を 移 植 し た 。 5 日 後 、
H G F / N K 4 又 は 生 理 食 塩 水 (コ ン ト ロ ー ル) を 含 む
浸 透 圧 ポ ン プ (Alzet 社 製) を 背 部 皮 下 に 埋 め 、 2 週 間 H
5 G F / N K 4 又 は 生 理 食 塩 水 を 持 続 的 に 移 植 癌 近 傍 に 注
入 し た 。 移 植 癌 の 体 積 を 経 時 的 に 測 定 し 、 癌 移 植 後 2 8
日 目 に 肺 表 面 の 転 移 性 腫 瘍 の 数 を 計 測 し た 。

移 植 癌 の 体 積 を 経 時 的 に 追 跡 し た 結 果 を 図 1 3 A に 、
図 1 3 B に 癌 移 植 後 2 8 日 目 に 肺 表 面 の 転 移 性 腫 瘍 の 数
10 を 示 す 。 図 か ら わ か る よ う に 、 生 理 食 塩 水 を 注 入 し た コ
ン ト ロ ー ル の 移 植 癌 は 移 植 後 1 0 日 以 降 急 速 に 成 長 し た
が 、 H G F / N K 4 は 癌 の 成 長 を 抑 制 し た 。 ま た 、 肺 転
移 に 関 し て は 、 コ ン ト ロ ー ル の 生 理 食 塩 水 注 入 群 で は 多
数 の 肺 転 移 巣 が 観 察 さ れ た の に 対 し て 、 H G F / N K 4
15 を 注 入 し た 個 体 で は 肺 転 移 の 抑 制 が 認 め ら れ た 。

こ れ ら の こ と か ら 、 H G F / N K 4 は 、 in vivo で jyg
乳 癌 の 成 長 及 び 転 移 を 有 意 に 抑 制 す る 作 用 を 有 し て い る
こ と が わ か る 。

20 製 剤 例 1

生 理 食 塩 水 1 0 0 m l 中 に 実 施 例 1 で 調 製 し た H G F
/ N K 4 (1 m g) 、 マ ン ニ ト ー ル (1 g) 及 び ポ リ ソ

ルベート 80 (10 mg) を含有する溶液を無菌的に調製し、1 ml ずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封して、本発明の血管新生抑制剤を凍結乾燥製剤として調製した。

5 製剤例 2

0.02 M リン酸緩衝液 (0.15 M NaCl 及び 0.01 % ポリソルベート 80 含有、pH 7.4) 100 ml 中に、実施例 1 で調製した HGF / NK4 1 mg 及びヒト血清アルブミン 100 mg を含む水溶液を無菌的に配合して、1 ml ずつバイアルに分注した。次いで、各バイアル中の液剤を凍結乾燥して密封して、本発明の血管新生抑制剤を凍結乾燥製剤として調製した。

製剤例 3

注射用蒸留水 100 ml 中に、実施例 1 で調製した HGF / NK4 (1 mg)、ソルビトール (2 g)、グリシン (2 g) 及びポリソルベート 80 (10 mg) を含む溶液を無菌的に調製し、1 ml ずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封して、本発明の血管新生抑制剤を凍結乾燥製剤として調製した。

本発明の血管新生抑制剤は、その血管新生抑制作用に基づいて、血管異常増殖に起因する種々の疾患、例えばリウマチ性関節炎，糖尿病性網膜症，未熟児網膜症，老人黄斑部変性，創傷治癒時の過剰瘢痕形成等の予防又は

5 治療剤として有用である。

10

15

20

請求の範囲

1. 下記の (a) 又は (b) に記載されるポリペプチド
5 を有効成分として含有する血管新生抑制剤。
- (a) Hepatocyte growth factor (HGF) の PyrGlu³²~Val⁴⁷⁸ からなるアミノ酸配列を有するポリペ
 プチド、
- (b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複
10 数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたア
 ミノ酸配列からなり、かつ c-Met / HGF レ
 セプターを介する HGF の作用に対してアンタゴ
 ニスト活性を有するポリペプチド
- 15 2. 上記ポリペプチドが、少なくとも一つのヘアピンド
 メイン及び4つのクリングルドメインを有するもので
 ある請求項1記載の血管新生抑制剤。
3. 上記ポリペプチドがHepatocyte growth factorをエ
20 ラスターゼで消化して得られるものである請求項1記
 載の血管新生抑制剤。

4. 配列番号 1 記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤。

5. 配列番号 2 記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤。

6. 請求項 1 記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む、血管異常増殖に起因する疾患の予防又は治療剤。

10

7. 血管異常増殖に起因する疾患が、リウマチ性関節炎、乾癬、オスラー-ウェバー (Osler-Webber) 症候群、心筋の脈管形成、末梢血管拡張症、血友病性関節症、眼の脈管形成性疾患、血管線維腫、良性腫瘍及び創傷肉芽形成よりなる群から選択されるいずれかである請求項 6 記載の予防又は治療剤。

15

8. 請求項 1 記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む、内皮細胞の過度な刺激によって生じる疾患の予防又は治療剤。

20

9. 内皮細胞の過度な刺激によって生じる疾患が、腸管

癒着、クローン病、アテローム硬化症、強皮症及び過剰瘢痕形成よりなる群から選択されるいずれかである請求項 8 記載の予防又は治療剤。

5 10. 請求項 1 記載のポリペプチド及び薬学的に許容される担体を含む受胎調節剤。

11. 下記(a)又は(b)に記載されるポリペプチド：

10 (a) Hepatocyte growth factor (HGF) のPyrGlu³²～Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつc-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド

15

及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を被験者に投与することからなる、血管新生抑制方法。

20 12. 下記(a)又は(b)に記載されるポリペプチド：

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) のPyrGlu³²～Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペ

プチド、

- (b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Met / HGF レセプターを介する HGF の作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド

及び薬学的に許容される担体を含む血管新生抑制剤を血管異常増殖に起因する疾患の予防または治療をうける被験者に投与することからなる、該疾患の予防または治療方法。

13. 上記疾患が、リウマチ性関節炎、乾癬、オスラー-ウェバー (Osler-Webber) 症候群、心筋の脈管形成、末梢血管拡張症、血友病性関節症、眼の脈管形成性疾患、血管線維腫、良性腫瘍、創傷肉芽形成、腸管癒着、クローン病、アテローム硬化症、強皮症及び過剰瘢痕形成よりなる群から選択されるいずれかである請求項 12 記載の予防又は治療方法。

14. 血管新生抑制剤の製造のための、下記 (a) 又は (b) に記載されるポリペプチドの使用：

(a) Hepatocyte growth factor (HGF) の PyrGlu

³² ~ Val⁴⁷⁸ からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

- (b) (a) のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Met / HGF レセプターを介する HGF の作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド。
- 5

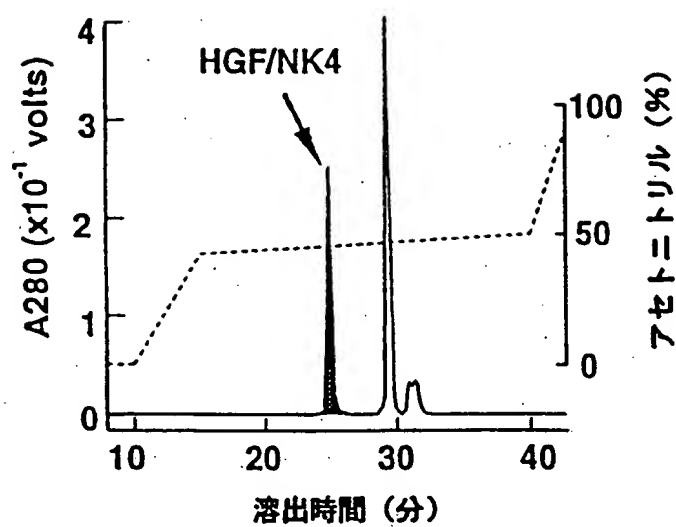
10

15

20

FIG. 1

A



B

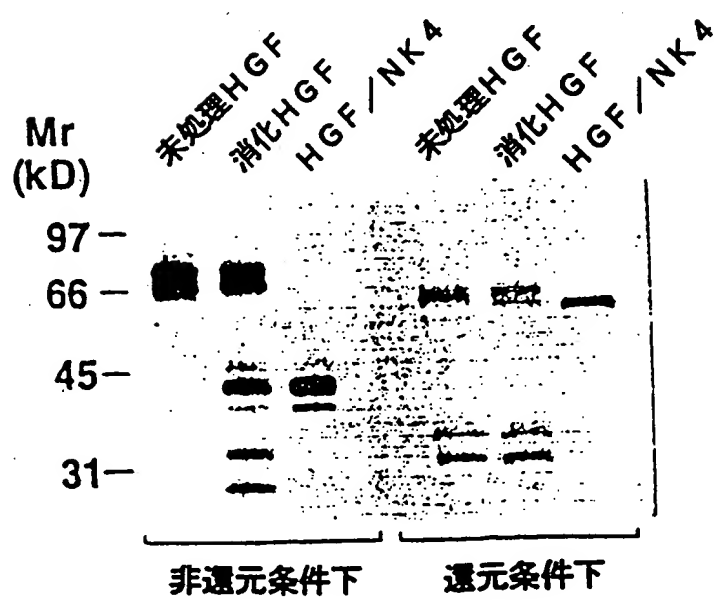


FIG. 2

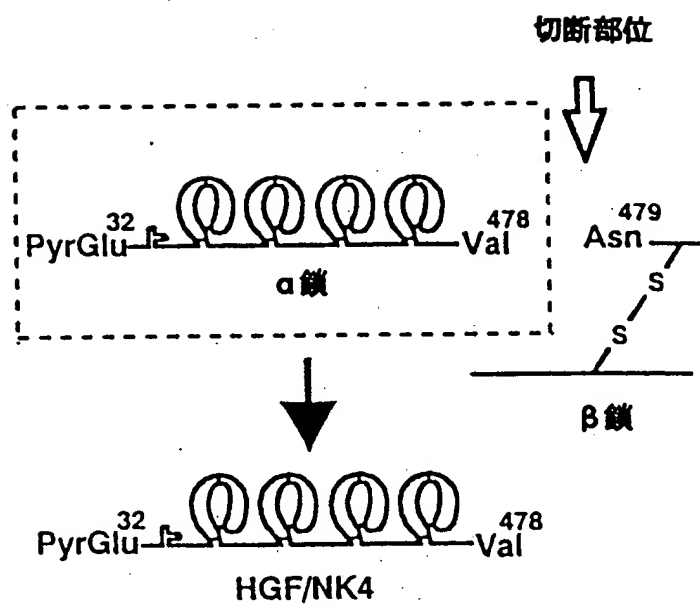


FIG. 3

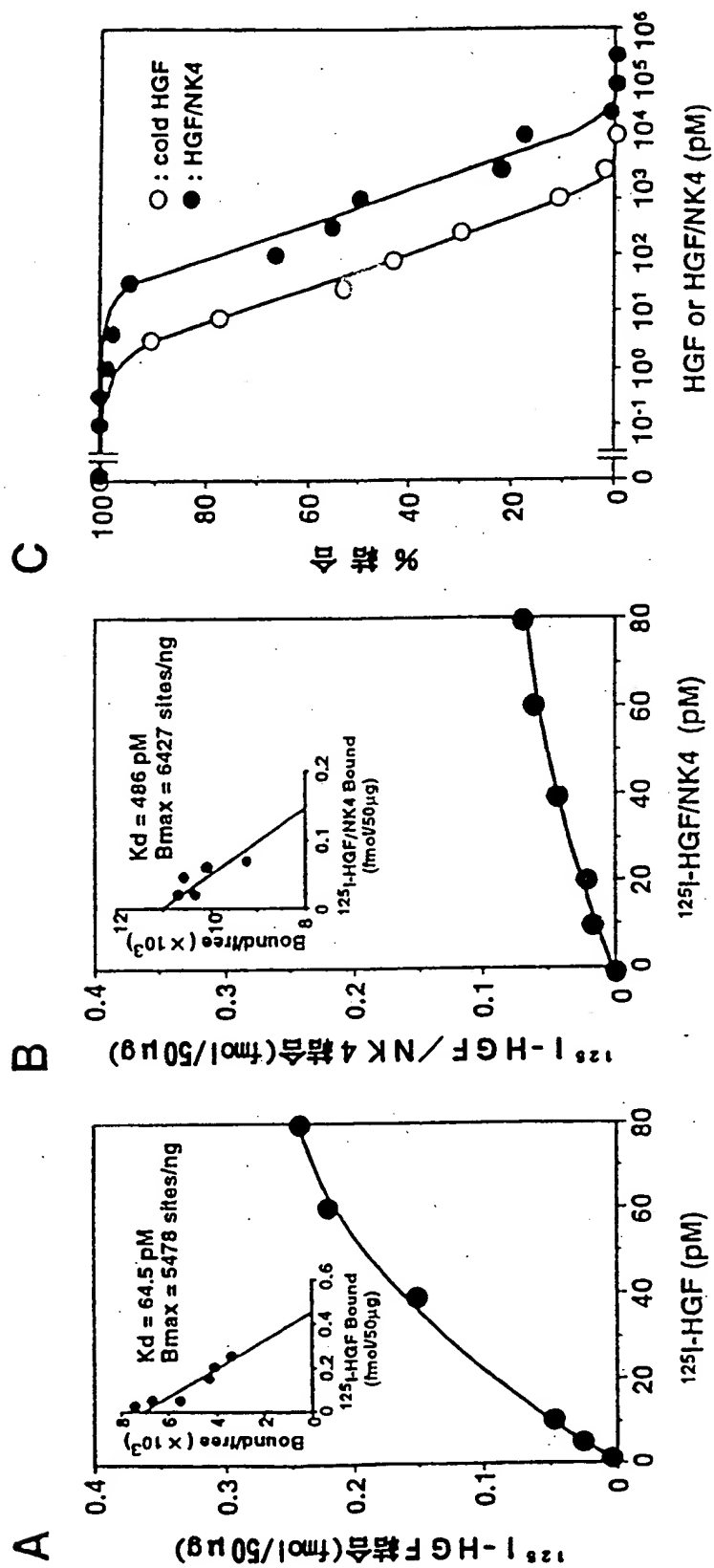


FIG. 4

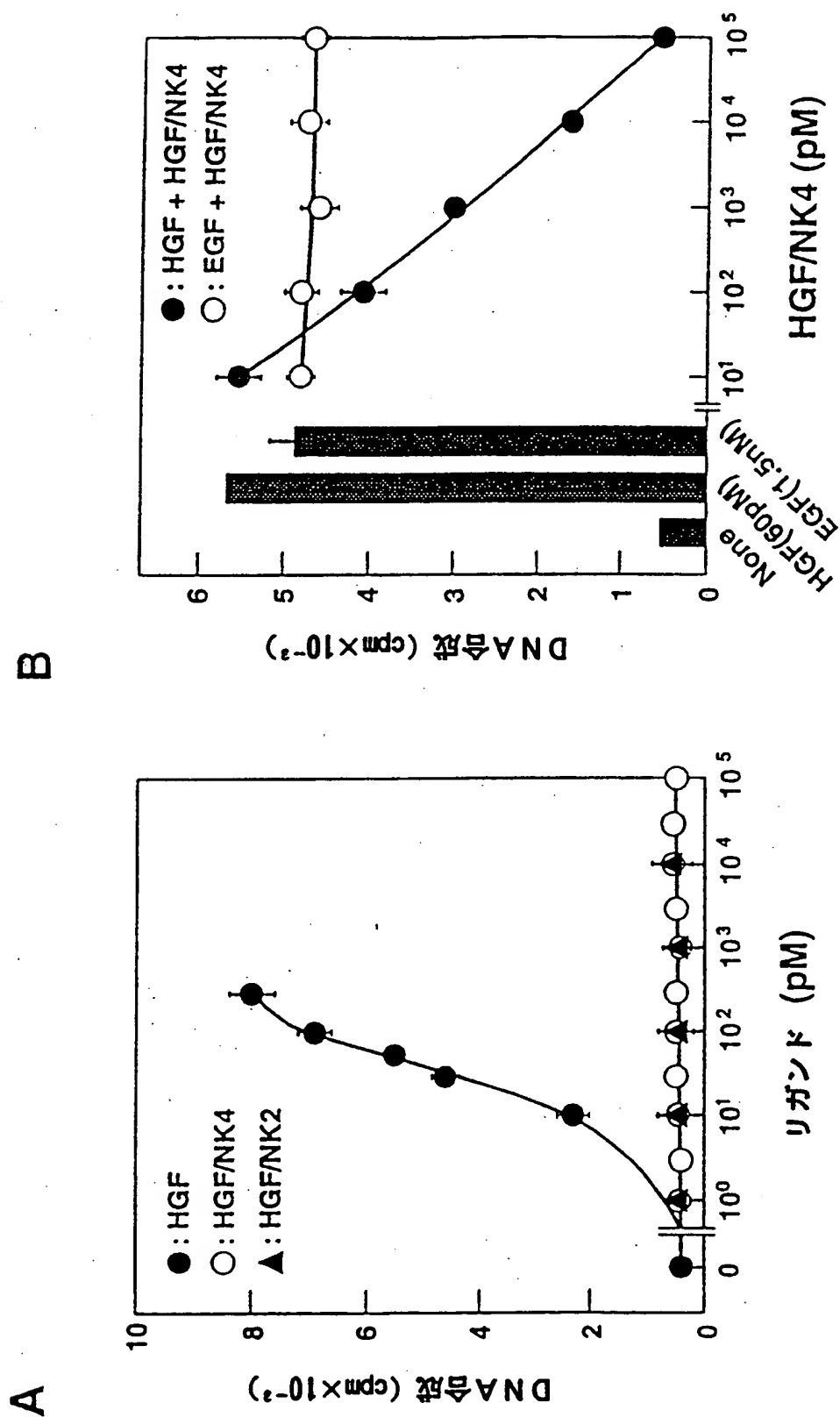


FIG. 5

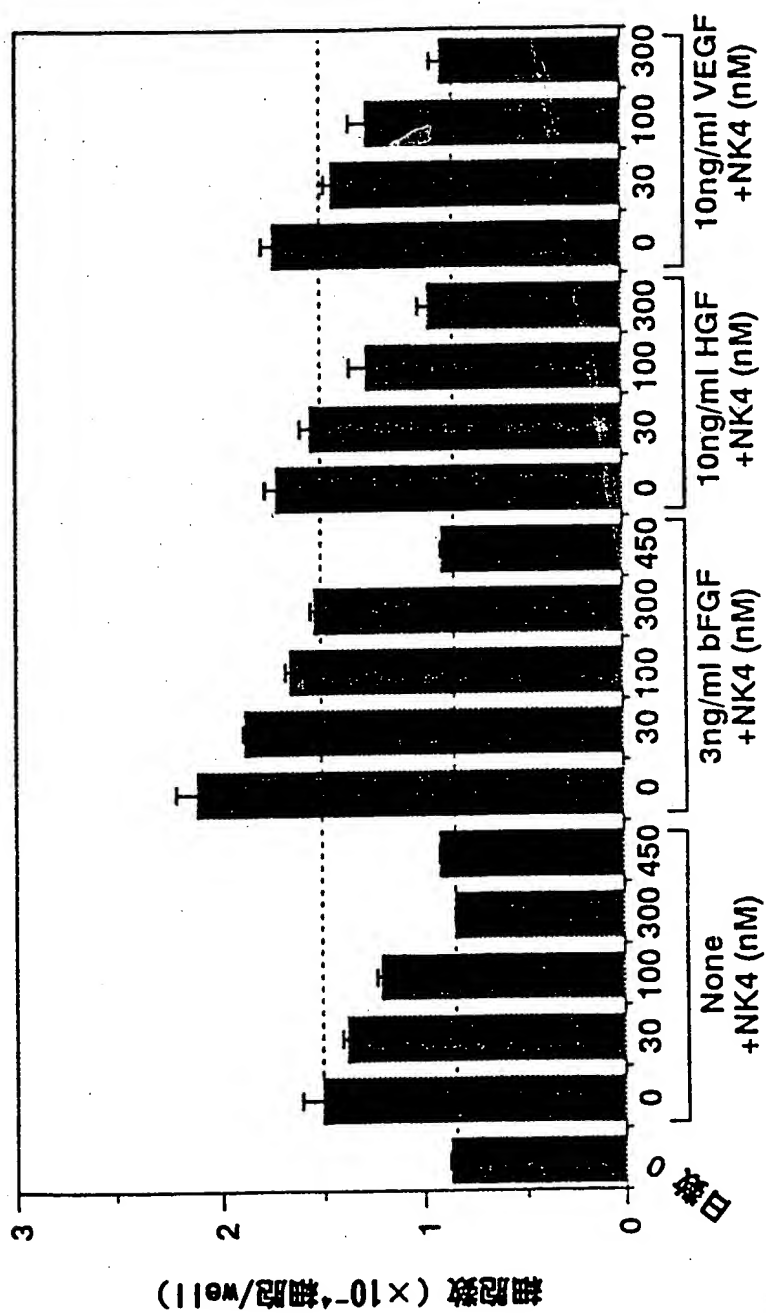


FIG. 6

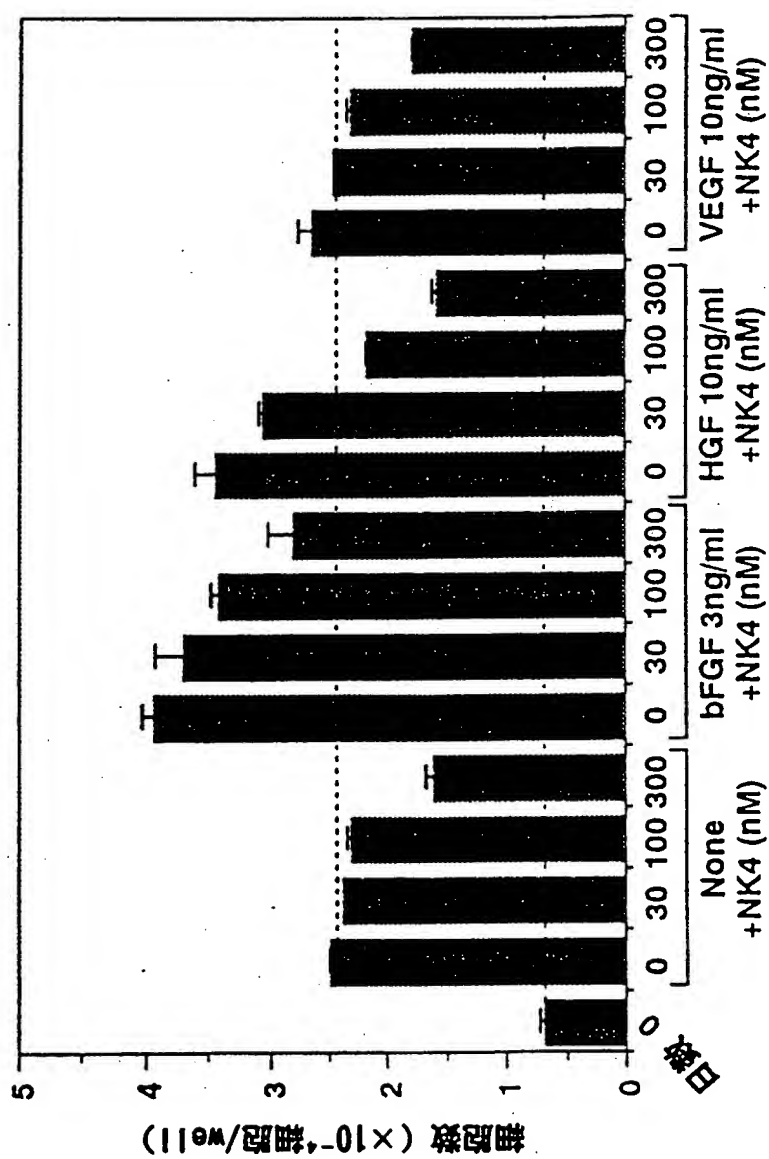


FIG. 7

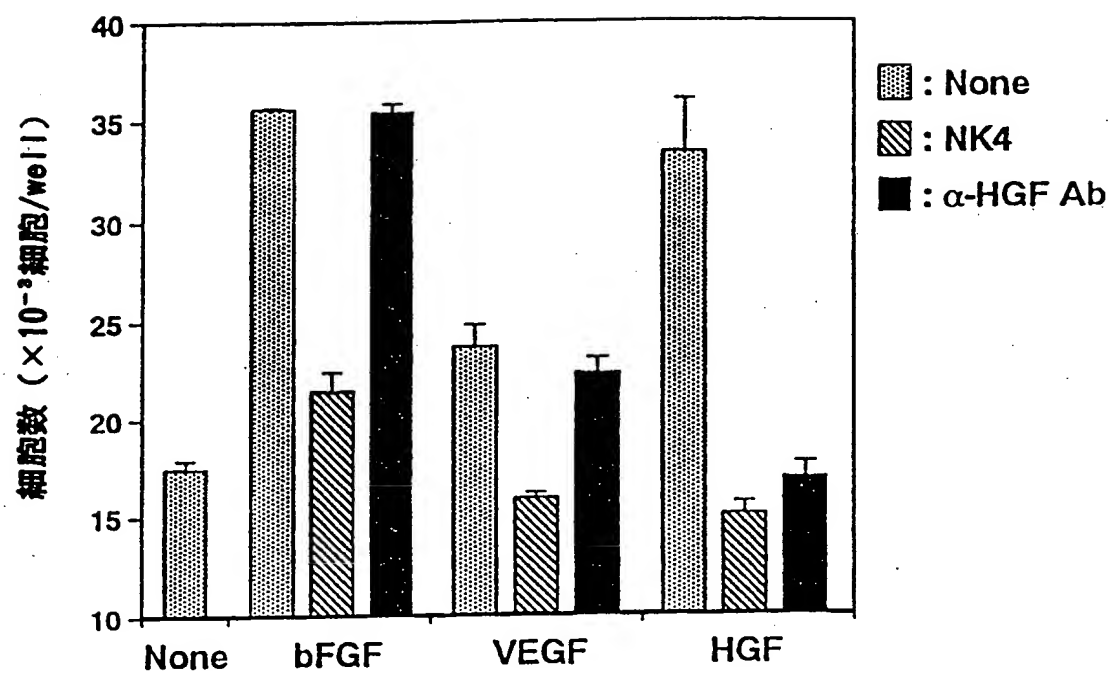


FIG. 8

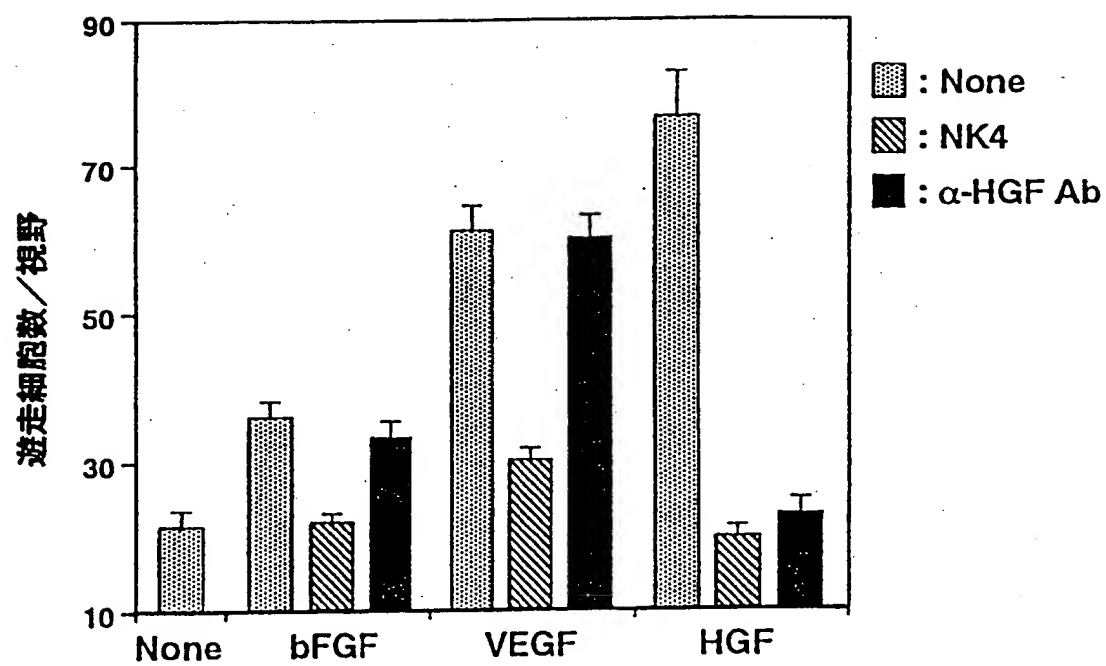
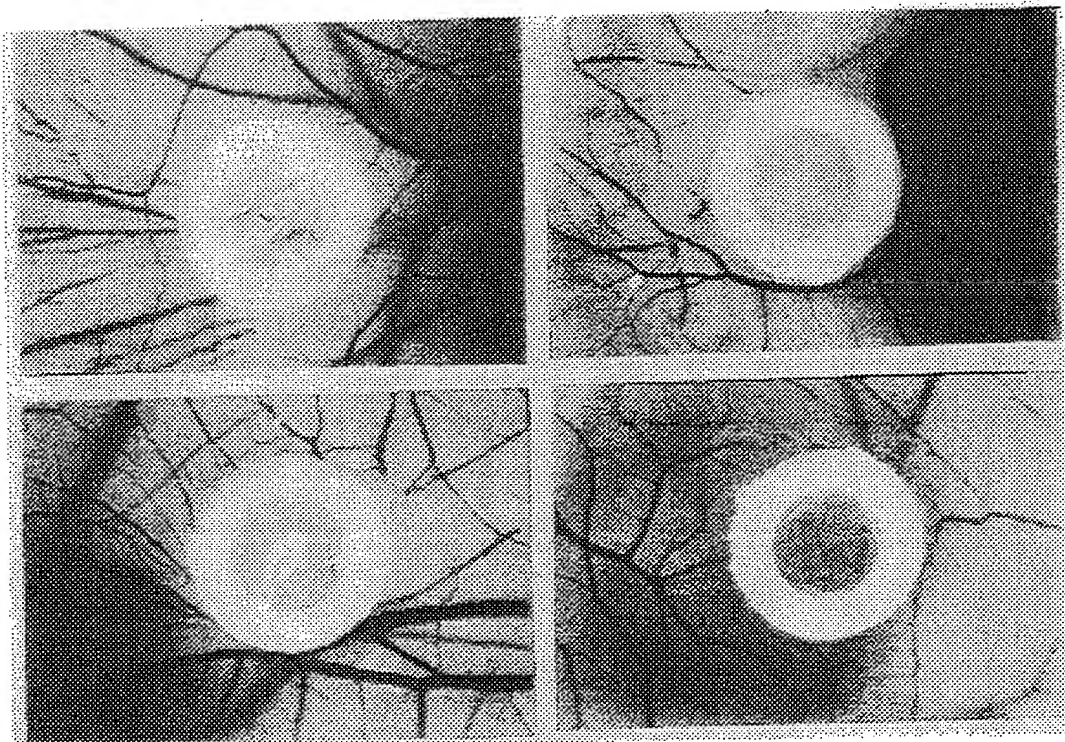


FIG. 9

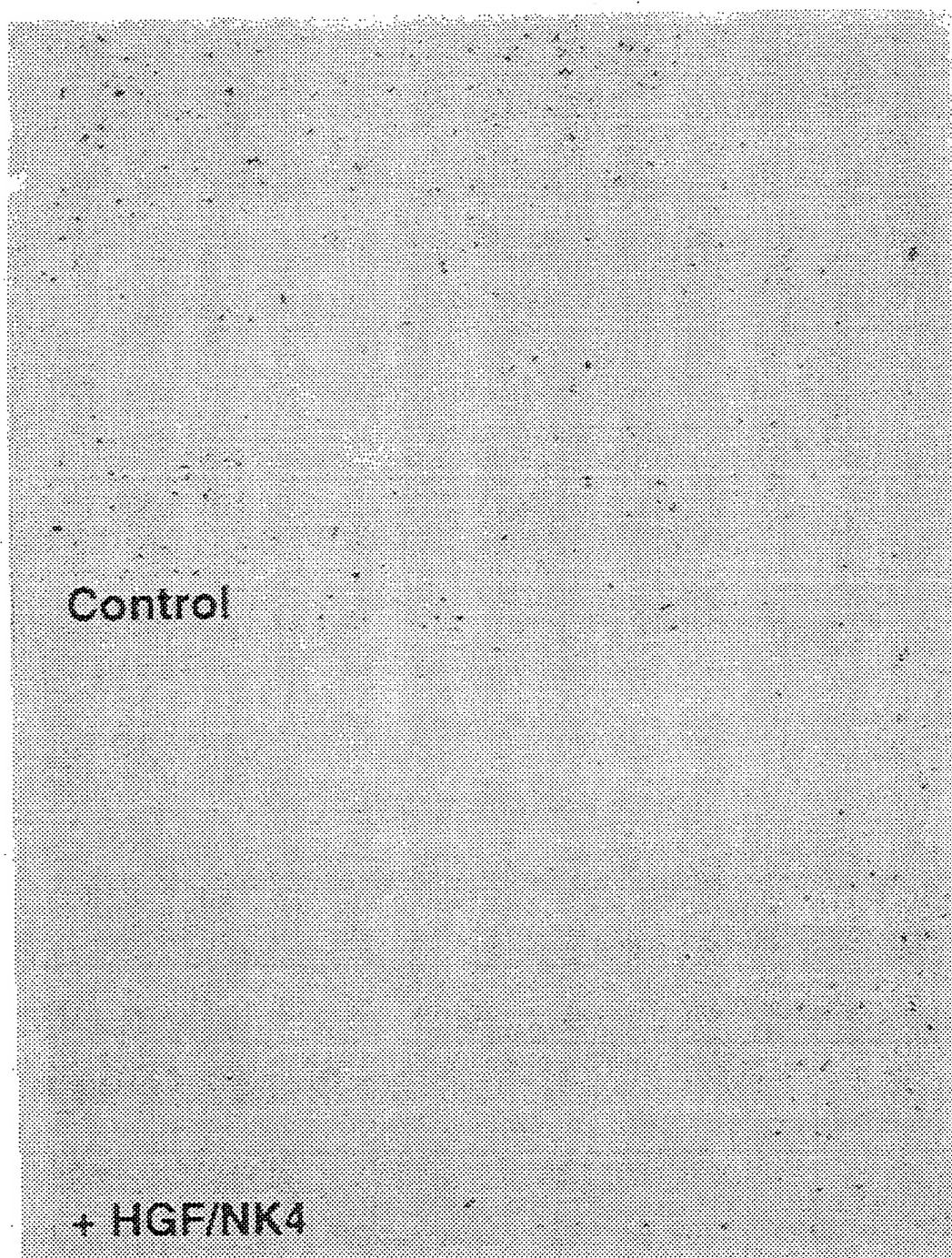
コントロール

NK4 20 μ g



$\times 8$

FIG. 10



内皮細胞特異的von Willebrand factor抗体用免疫染色

FIG. 11

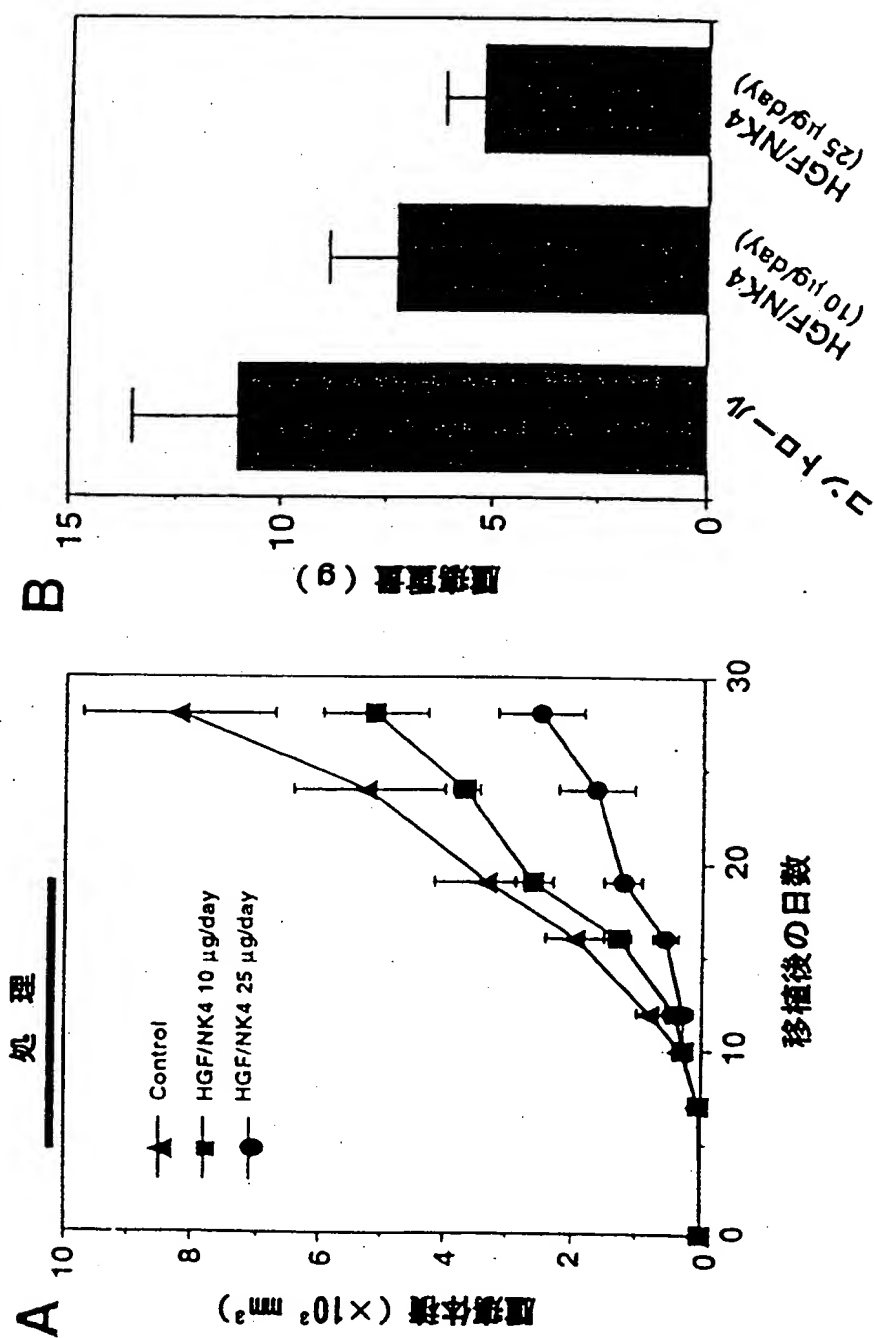
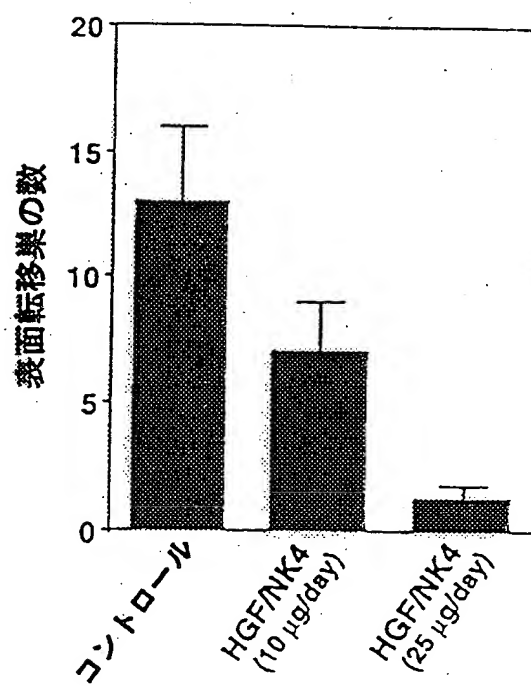


FIG. 12

A



B

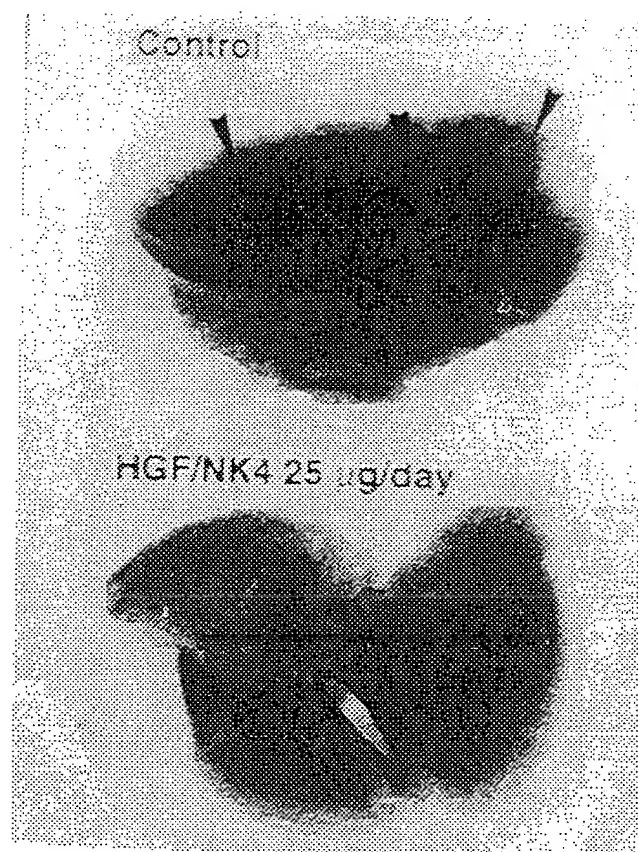
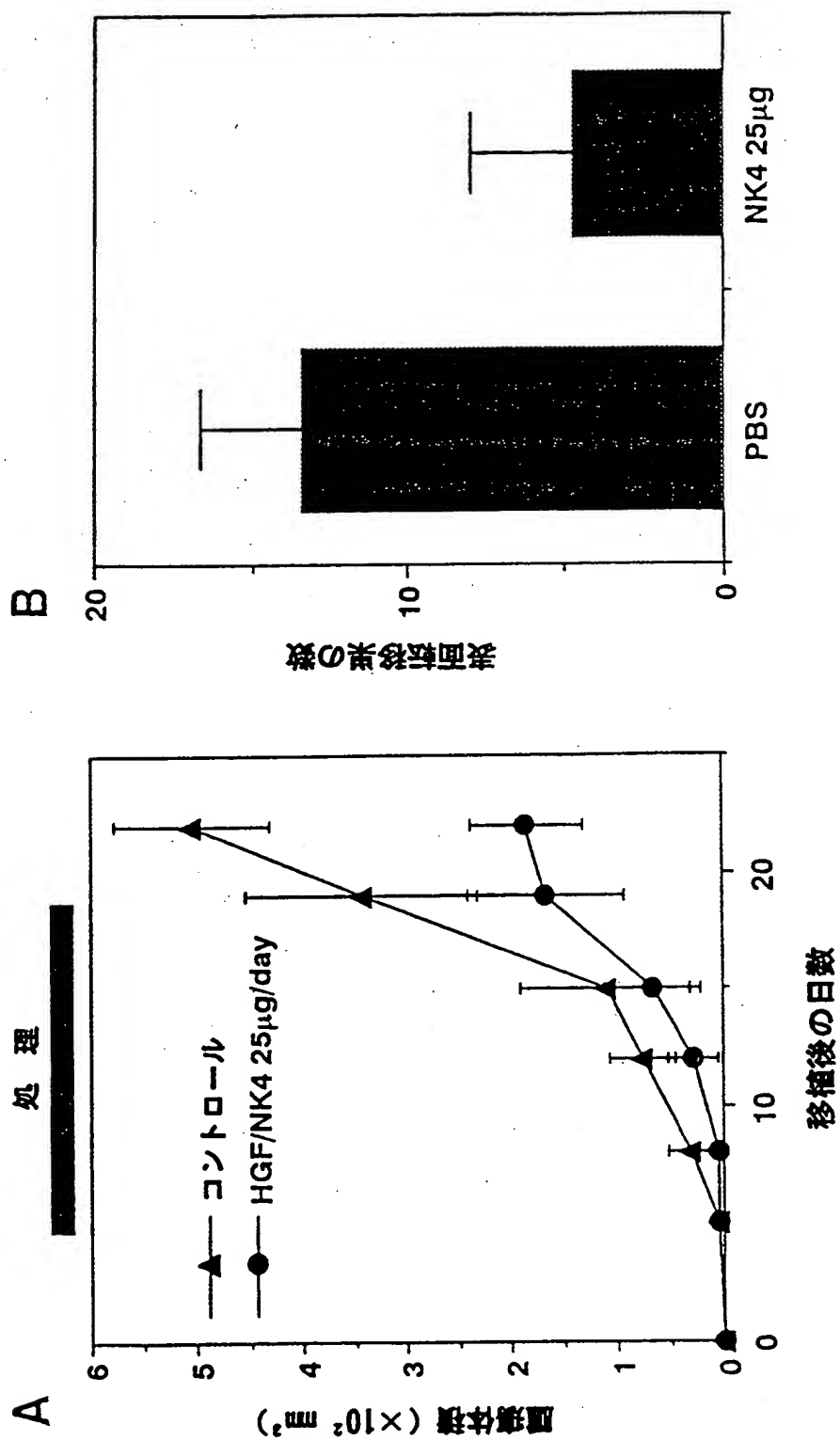


FIG. 13



SEQUENCE LISTING

<110> Nakamura, Toshikazu

<120> Inhibitor of Vascularization

<130> P99-10

<140>

<141>

<150> JP P1998/134681

<151> 1998-04-28

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 447

<212> PRT

<213> Human

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> pyroglutamate

<220>

<221> CHAIN

2/8

<222> (1).. (447)

<223> N-terminal region of alpha-chain in HGF

(PyrGlu32-Val478/HGF)

<300>

<301> Nakamura, Tshikazu

<303> Nature

<304> 342

<306> 440-443

<307> 1989

<400> 1

Xaa Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys

1

5

10

15

Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys

20

25

30

Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly

35

40

45

Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln

50

55

60

Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu

65

70

75

80

Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn

85

90

95

3/8

Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr
100 105 110

Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu
115 120 125

His Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn
130 135 140

Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr
145 150 155 160

Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser
165 170 175

Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met
180 185 190

Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr
195 200 205

Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe
210 215 220

Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys
225 230 235 240

Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr
245 250 255

4/8

Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr

260

265

270

Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr

275

280

285

Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His

290

295

300

Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu

305

310

315

320

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr

325

330

335

Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys

340

345

350

Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr

355

360

365

Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp

370

375

380

Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp

385

390

395

400

Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala

405

410

415

5/8

His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr
420 425 430

Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val
435 440 445

<210> 2

<211> 442

<212> PRT

<213> Human

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(442)

<223> N-terminal region of alpha-chain in HGF
(pyrGlu32-Val478/HGF)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (130)..(131)

<223> deletion of 5 amino acids

<400> 2

Xaa Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys
1 5 10 15

Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys
20 25 30

6/8

Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly

35

40

45

Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln

50

55

60

Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu

65

70

75

80

Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn

85

90

95

Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr

100

105

110

Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu

115

120

125

His Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro

130

135

140

Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val

145

150

155

160

Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met

165

170

175

Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser

180

185

190

7/8

Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys

195

200

205

Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys

210

215

220

Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro

225

230

235

240

His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr

245

250

255

Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly

260

265

270

Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile

275

280

285

Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr

290

295

300

Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn

305

310

315

320

Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile

325

330

335

Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly

340

345

350

8/8

Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser
355 360 365

Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu
370 375 380

Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn
385 390 395 400

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys
405 410 415

Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg
420 425 430

Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val
435 440

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/01834

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ A61K38/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁶ A61K38/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), Swissprot, PIR, GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATE, K., et al., "HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor" FEBS Lett., 1997, Vol. 420, No. 1, p.1-6, Refer to the full text	1-10, 14
Y	BUSSOLINO, F., et al., "Hepatocyte Growth Factor Is a Potent Angiogenic Factor Which Stimulates Endothelial Cell Motility and Growth" J. Cell. Biol., 1992, Vol. 119, No. 3, p.629-641 Abstract, p.636-638: "Refer to In Vivo Angiogenic Effect of HGF"	1-10, 14
Y	NISHIMURA, M., et al., "Serum Hepatocyte Growth Factor as a Possible Indicator of Vascular Lesions" Rinsho Byori, 1997, Vol. 45, No. 9, p.831-836 Refer to abstract, study (see also Chemical Abstracts, 1997, Vol. 127, No. 18, abst. no. 246281y)	1-10, 14
Y	EP, 461560, A1 (NAKAMURA, Toshikazu), 18 December, 1991 (18. 12. 91), Refer to Fig. 2 & JP, 5-111383, A	1-10, 14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
7 June, 1999 (07. 06. 99)

Date of mailing of the international search report
15 June, 1999 (15. 06. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01834

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-13

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 11 to 13 pertain to methods for prevention or treatment of the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.⁶ A61K38/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.⁶ A61K38/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), Swissprot, PIR, GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	DATE, K., et al., 'HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor' FEBS Lett., 1997, Vol.420, No.1, p.1-6, 全文参照	1-10, 14
Y	BUSSOLINO, F., et al., 'Hepatocyte Growth Factor Is a Potent Angiogenic Factor Which Stimulates Endothelial Cell Motility and Growth' J. Cell. Biol., 1992, Vol.119, No.3, p.629-641 Abstract, p.636-638: 'In Vivo Angiogenic Effect of HGF' 参照	1-10, 14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.06.99

国際調査報告の発送日

15.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治

印

4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	NISHIMURA, M., et al., 'Serum Hepatocyte Growth Factor as a Possible Indicator of Vascular Lesions' Rinsho Byori, 1997, Vol. 45, No. 9, p. 831-836 要約及び考察を参照 (see also Chemical Abstracts, 1997, Vol. 127, No. 18, abst. no. 246281y)	1-10, 14
Y	EP, 4 6 1 5 6 0, A 1 (NAKAMURA, Toshikazu), 18. 12月. 1991 (18. 12. 91), Fig. 2 参照 & JP, 5-111383, A	1-10, 14

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-13 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 11-13 は、人間の予防または処置方法に関するものであって、PCT 17 条 (2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。